

Universidade da Beira Interior

Universidade do Minho



Escola de Ciências

Estudo dos parâmetros bioquímicos da película lacrimal

Ana Isabel Cardoso Puinhas

Dissertação submetida à Universidade da Beira Interior para obtenção do
grau de Mestre em Bioquímica

Orientadores:

Professora Doutora Maria Madalena da Cunha Lira

Professora Doutora Cândida Ascensão Teixeira Tomaz

Ao Tiago, pelos nossos sonhos...

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) por me ter proporcionado a integração no grupo de investigação do Centro de Física da Universidade do Minho.

Agradeço também às minhas orientadoras Doutora Elisabete Oliveira, Doutora Madalena Lira e Doutora Cândida Tomaz, que me apoiaram ao longo do desenvolvimento deste projecto, sempre com toda a disponibilidade para me ajudar a encontrar soluções, para todas as situações que foram surgindo.

Queria apresentar também a minha gratidão à Doutora Célia Pais e Doutora Ana Paula Sampaio, por todo o suporte técnico e teórico e por me ter permitido o uso das instalações do Departamento de Biologia essenciais à execução deste projecto.

O meu muito obrigado à Dra. Elisabete Coutinho, o seu apoio técnico e científico foi fundamental. Como não poderia deixar de ser, agradeço à minha amiga Susana Machado, por todas as horas em que pacientemente me acompanhou, durante este projecto.

Índice

Lista de abreviaturas e fórmulas químicas	9
Resumo	13
Abstract	15
Capítulo 1. INTRODUÇÃO	17
Capítulo 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 A importância do estudo do filme lacrimal	20
2.2 Organização da película lacrimal	21
2.2.1 Formação, distribuição e eliminação lacrimal	21
2.2.2 Organização trilaminar do filme lacrimal	24
2.2.2.1 A camada lipídica	24
2.2.2.2 A camada aquosa	25
2.2.2.3 A camada posterior de Mucina	25
2.3 Composição do filme lacrimal	26
2.3.1 Lípidos	28
2.3.2 Proteínas	28
2.3.2.1 As proteínas do grupo A	28
2.3.2.2 As proteínas do grupo B	28
2.4 Propriedades físico-químicas do filme lacrimal	31
2.4.1 Índice de refração	31
2.4.2 pH	31
2.4.3 Pressão osmótica	31
2.4.4 Viscosidade	32
2.4.5 Condutividade térmica	32
2.4.6 Temperatura	32
2.4.7. Tensão superficial	32
2.4.7.1 Formação da película lacrimal	34
2.4.7.2 Papel das proteínas na tensão superficial	35
2.5 Lágrima basal versus reflexa	36
2.6 Avaliação da película lacrimal	38
2.6.1 Provas de determinação do tempo de ruptura lacrimal	38
2.6.1.1 BUT	39
2.6.1.2 NI BUT	40
2.6.1.2.1 O Tearscope plus	41
2.6.2 Provas de determinação da tensão superficial pelo método de Langmuir Blodgett	43
2.6.3 Determinação do perfil proteico pelo método de Electroforese	45
2.6.4 Quantificação das proteínas lacrimais pelo método de ELISA	45

Capítulo 3. DESENVOLVIMENTO DO PROJECTO E METODOLOGIA APLICADA	46
3.1 Determinação da população em estudo	47
3.2 Optimização das técnicas de análise lacrimal	48
3.3. Avaliação da qualidade lacrimal	51
3.4. Recolha e conservação do filme lacrimal	52
3.5. Análise e separação proteica do filme lacrimal por Electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	53
3.5.1 Electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições nativas	55
3.5.1.1 Preparação do gel de poliacrilamida não desnaturante	55
3.5.1.2 Soluções necessárias à preparação do gel de poliacrilamida	57
3.5.1.3 Preparação e separação das amostras na câmara electroforética	57
3.5.2 Electroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	58
3.5.2.1 Preparação do gel de poliacrilamida SDS	58
3.5.2.2 Soluções necessárias à preparação do gel de poliacrilamida	60
3.5.2.3 Preparação e separação das amostras na câmara electroforética	60
3.5.3. Coloração proteica com nitrato de prata	61
3.6. Quantificação de proteínas de interesse por Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	63
3.6.1. Quantificação da Imunoglobulina A (IgA)	65
3.6.2. Factor de Necrose Tumoral (TNF- α)	65
3.7 Determinação da Tensão Superficial pelo método de Langmuir-Blodgett	66
3.8 Análise Estatística	69
Capítulo 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	70
4.1 Avaliação da qualidade lacrimal	70
4.2. Análise e separação proteica do filme lacrimal	72
4.2.1 Electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições nativas	72
4.2.2 Electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	73
4.3 Determinação da variação de proteínas de interesse por ELISA	77
4.3.1 Imunoglobulina A	77
4.3.2 Determinação do Factor de Necrose Tumoral (TNF- α)	81
4.4 Determinação do Tensão Superficial pelo método de Langmuir-Blodgett	88
Capítulo 5. CONCLUSÕES	97
Perspectivas Futuras	99
Referências Bibliográficas	101
Anexos	108

Índice de Figuras

	22
Figura 2.1 - Sistema lacrimal.	
Figura 2.2 - Representação das glândulas responsáveis pela secreção do filme lacrimal.	22
Figura 2.3 - Estrutura trilaminar do filme lacrimal.	24
Figura 2.4 - Ilustração esquemática da interacção de moléculas na interface e no interior.	33
Figura 2.5 - Observação da ruptura lacrimal.	39
Figura 2.6 - Observação da superfície corneal após instilação de Fluoresceína (teste BUT).	40
Figura 2.7 - <i>Tearscope Plus</i> .	42
Figura 2.8 - Miras projectadas sobre a córnea com o <i>Tearscope</i> .	43
Figura 2.9 - Ilustração esquemática de uma balança de Langmuir-Blodgett(LB)	44
Figura 3.1 - Microcapilares utilizados na recolha lacrimal.	49
Figura 3.2 - Recolha da lágrima por capilaridade.	52
Figura 3.3 - Armazenamento das amostras lacrimais recolhidas em ependorf's.	53
Figura 3.4 - Componentes do sistema Mini-PROTEAN 3.	54
Figura 3.5 - Placa de ELISA com 96 poços.	64
Figura 3.6 - Placa de ELISA com 96 poços. Após a reacção enzimática de detecção do antígeno.	64
Figura 3.7 - Esquema da balança de Langmuir- Blodgett.	66
Figura 3.8 - Formação da monocamada.	67
Figura 3.9 - Construção das isotérmicas de Langmuir.	67
Figura 3.10 - Colocação da lágrima com auxílio da micro-seringa.	68
Figura 3.11 - Barreiras no estado de expansão (A) e de compressão (B).	68
Figura 4.1 - Bandas proteicas separadas em gel de poliacrilamida 10% em condições nativas.	73
Figura 4.2 - Proteínas constituintes do marcador de pesos moleculares.	74
Figura 4.3 - Bandas proteicas separadas em gel de poliacrilamida-SDS 12%.	74
Figura 4.4 - Gráfico que relaciona a distância percorrida no gel e peso molecular (PM) da proteína correspondente.	75
Figura 4.5 - Determinação das proteínas correspondentes a cada banda.	76
Figura 4.6 - Gráfico da calibração dos valores de densidade óptica e [IgA] correspondente.	78
Figura 4.7 - Comparação entre as [IgA] do período da manhã e período da tarde.	80
Figura 4.8 - Curva de calibração dos valores de densidade óptica e [TNF] correspondente.	83
Figura 4.9 - Comparação entre as [TNF] do período da manhã e período da tarde.	85
Figura 4.10 - Empacotamento das moléculas em diferentes fases da isotérmica de um fosfolípido.	89
Figura 4.11- Comparação do traçado das Isotérmica de Langmuir do indivíduo 1, relativamente às amostras recolhidas no periodo matinal e da tarde.	90
Figura 4.12 - Comparação do traçado das Isotérmica de Langmuir do indivíduo 2, relativamente às amostras recolhidas no periodo matinal e da tarde.	91

Figura 4.13 - Comparação do traçado das Isotérmica de Langmuir do indivíduo 3, relativamente às amostras recolhidas no periodo matinal e da tarde.	91
Figura 4.14 - Comparação do traçado das Isotérmica de Langmuir do indivíduo 4, relativamente às amostras recolhidas no periodo matinal e da tarde.	92
Figura 4.15 - Comparação do traçado das Isotérmica de Langmuir do indivíduo 5, relativamente às amostras recolhidas no periodo matinal e da tarde.	92
Figura 4.16 - Comparação do traçado das Isotérmica de Langmuir do indivíduo 6, relativamente às amostras recolhidas no periodo matinal e da tarde.	93
Figura 4.17 - Comparação do traçado das Isotérmica de Langmuir do indivíduo 7, relativamente às amostras recolhidas no periodo matinal e da tarde.	93
Figura 4.18 - Comparação do traçado das Isotérmica de Langmuir do indivíduo 8, relativamente às amostras recolhidas no periodo matinal e da tarde.	94
Figura 4.19 - Comparação do traçado das Isotérmica de Langmuir do indivíduo 9, relativamente às amostras recolhidas no periodo matinal e da tarde.	94

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Composição do filme lacrimal.	27
Tabela 3.1 - Composição do gel de poliacrilamida (PAGE).	56
Tabela 3.2 - Composição do gel de poliacrilamida (SDS- PAGE).	59
Tabela 4.1 - Valores médios, mínimos e máximos de NIBUT para o período matinal e da tarde.	71
Tabela 4.2 - Valores da densidade óptica a 450 nm para as amostras de calibração.	78
Tabela 4.3 - Valores de densidade óptica e concentração correspondente para IgA	79
Tabela 4.4 - Valores de densidade óptica e concentração correspondente para IgA tratados estatisticamente no SPSS.	79
Tabela 4.5 - Valores da densidade óptica a 450 nm para as amostras de calibração.	83
Tabela 4.6 - Valores de densidade óptica e concentração correspondente para TNF-α.	84
Tabela 4.7 - Valores de densidade óptica e concentração correspondente para o TNF-α tratados estatisticamente no SPSS.	84
Tabela 4.8 - Valores de Pressão Superficial obtidos pelo método de Langmuir-Blodgett para as amostras lacrimais do olho esquerdo recolhidas nos dois períodos de avaliação.	88
Tabela 8.1 - Valores das 3 medidas NIBUT realizadas, durante o período da manhã e da tarde, de cada um dos 20 indivíduos.	108

Lista de Abreviaturas

a.a	Aminoácido
AP	Persulfato de amónio
BUT	Do inglês Break Up Time
DNA	Acido Desoxirribonucleico (do inglês, Desoxirribonucleic Acid)
ELISA	Do inglês Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
HPLC	Do inglês High Performance Liquide Chromatography
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12p70	Interleucina 12 forma biologicamente activa do heterodimero de 2 subunidades de 40 e 35Kilodaltons
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M

KDa	Kilodalton
LC.	Lentes de contacto
ml	Mililitro
NIBUT	Do inglês Non Invasive Break Up Time
OD	Olho Direito
OE	Olho Esquerdo
PAGE	Do inglês polyacrylamide gel electrophoresis
pg	Picogramas
POTF	Filme lacrimal pré-ocular
PLTF	Filme lacrimal pré-lente
RPM	Proteína de migração rápida
SDS	Do inglês Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Do inglês Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SE-HPLC	Do inglês size exclusion High Performance Liquide Chromatography
TNF	Factor de necrose tumoral
TEMED	N,N,N',N' - Tetrametilenodiamina

Tris tris(hidroximetil)aminometano

μl Microlitros

μm Micrómetros

Fórmulas Químicas

AgNO₃ Nitrato de prata

CH₃COOH Ácido acético

H₂O Água

H₂O₂ Peróxido de hidrogénio

HCL Ácido clorídrico

NaCO₃ Carbonato de sódio

CH₃OH Metanol

O₂ Oxigénio molecular

Na₂S₂O₃ Tiosulfato de sódio

Resumo

Com o constante avanço da Contactologia a nível mundial, são cada vez mais os usuários de lentes de contacto quer no mercado nacional, quer no internacional. Este facto tem levado a uma incessante introdução de novos materiais, que trazem um maior conforto e qualidade visual para os seus utilizadores. Ao mesmo tempo, multiplicam-se os estudos que revelam que o uso de lentes de contacto está associado às alterações fisiológicas e bioquímicas a nível ocular, e que estas serão eventualmente causadoras do desconforto visual e sintomatologia referida pelos seus usuários, como é o caso da síndrome de olho seco. Contudo é importante avaliar se essas alterações fisiológicas são realmente resultantes do uso de lentes de contacto, ou se por sua vez são variáveis pré-existentes, habituais do ciclo fisiológico ocular, que ocorrem também em não usuários de lentes de contacto.

Mediante tais dúvidas, o objectivo principal deste projecto de investigação foi estudar a estabilidade e composição bioquímica do filme lacrimal sob o ponto de vista proteico e fisiológico em não usuários de lentes de contacto. Um ponto crucial deste trabalho consistiu na avaliação da manutenção das propriedades e composição do filme lacrimal, nas condições ditas normais, como é o caso do ciclo diário.

A amostra foi constituída por vinte indivíduos pertencentes à população universitária, com idades compreendidas entre os 20 e 28 anos, não usuários de lentes de contacto e sem história clínica relevante.

A qualidade lacrimal foi avaliada em dois períodos do dia, um no início da manhã e outro no fim da tarde, através da medida do tempo de ruptura lacrimal não invasivo (NIBUT) medidos com o *Tearscope*. Procedeu-se também à recolha lacrimal de ambos os olhos por capilaridade. O perfil proteico da lágrima foi analisado por electroforese desnaturante, SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) e nativa, PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*). As proteínas IgA e TNF α foram

quantificadas por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), e a sua tensão superficial da lágrima foi determinada pelo método de Langmuir -Blodgett.

Os resultados apresentados nesta tese mostram que existem variações diárias, na composição e propriedades do filme lacrimal, o que pode indicar que as alterações na sua composição, não têm que ser necessariamente provocadas pelo uso de lentes de contacto ou pela presença de patologias oculares e sistémicas.

Abstract

With the constant advancement of contact lens in the world, the users of contact lenses (CL) are increasing, either in the domestic or internationally market. This has led to a continual introduction of new materials that bring greater comfort and visual quality to their users. On the other hand, several studies reveal complications after lens use, at the physiological eye level, mainly at the biochemical point of view such as dry eye syndrome. However it is important to evaluate whether these physiological changes are actually resulting from the use of contact lenses, or if variables are in turn pre-existing customary ocular physiological cycle that also occur in non-contact lenses.

Through such doubts the main objective of this research project was to study the biochemical composition of the tear film from the physiological point of view and protein contents in non-contact lenses users. A crucial point of this study was to assess the maintenance of the properties and composition of the tear film in called normal conditions, such as the diurnal cycle.

The sample population consists of individual from the university population, aged between 20 and 28 years, non-users of contact lenses and, without clinical relevance.

The tear quality was assessed twice during the day; one early in the morning and another in the evening, through the values measured with the non invasive break up time (NIBUT) Tearscope. The tear from both eyes was also collect by capillarity and its protein profile was analyzed by desnaturing polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) and native electrophoresis PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis); IgA and TNF- α were quantified by ELISA (Enzyme Linked Immuno sorbent assay) while tear surface tension was measured by Langmuir method.

We conclude that there are daily variations in composition and properties of the tear film. What may indicate that changes in composition do not necessarily have to be caused by the use of contact lenses or by presence of ocular and systemic pathologies.

Capítulo 1. Introdução

A saúde ocular tem ocupado nos últimos anos um espaço importante nas actividades de investigação, de forma a compreender e solucionar os problemas fisiológicos e sintomatologia apresentada pelos pacientes usuários de LC. Não é por isso de espantar que grupos de investigação, de áreas como a Bioquímica e Contactologia trabalhem cada vez mais como um todo, já que só o conhecimento exacto dos parâmetros bioquímicos lacrimais permite compreender as situações com que nos deparamos num consultório de Contactologia e Optometria.

Muito se tem discutido e investigado acerca da sintomatologia de desconforto ocular descrita por usuários de lentes de contacto, independentemente da melhoria dos materiais usados no seu fabrico em termos de biocompatibilidade. Multiplicam-se os estudos que reportam alterações da superfície ocular, parâmetros físicos, químicos e bioquímicos da película lacrimal, durante o uso de lentes de contacto, e que por sua vez, estas alterações serão eventualmente as responsáveis do desconforto visual referido pelos pacientes usuários de LC, sobretudo ao final do dia.

Contudo é importante não esquecer que existem muitos pacientes não usuários de LC, que também referem esse mesmo desconforto ocular, nomeadamente a secura ocular, irritação e sensação de ardência associada a sinais de hiperemia. Pelo que parece possível que também estes pacientes estejam sujeitos a alterações fisiológicas de relevância. Existe mesmo um estudo (Wolkoff *et al.*, 2003) e um trabalho recente desta universidade não publicado, que abordam a questão da sintomatologia de desconforto ocular como podendo estar associada às condições de trabalho, em termos de iluminação, temperatura, humidade e às condições ambientais, tais como contaminação atmosférica por poeiras ou químicos. Uma das queixas frequentes de um elevado número de pacientes está relacionada com o uso de computadores, ou seja após um período prolongado de uso e sobretudo ao final do dia, notam uma certa secura e irritação ocular, estejam ou não a usar lentes de contacto. Por isso, é importante avaliar se essas alterações fisiológicas são realmente resultante do uso de lentes de contacto, ou

se por sua vez, são variáveis pré-existentes, habituais do ciclo fisiológico ocular que ocorrem também em não usuários de lentes de contacto.

Perante tantas questões e possibilidades, o objectivo principal deste projecto de investigação foi estudar a estabilidade e manutenção diária da composição bioquímica do filme lacrimal sob o ponto de vista proteico e fisiológico em não usuários de lentes de contacto. Um ponto crucial deste trabalho consistiu na avaliação da manutenção das propriedades e composição do filme lacrimal, nas condições ditas normais, como é o caso do ciclo diário, com especial relevância para o início da manhã (período compreendido entre as 9 e 10h), onde habitualmente não são referidos sintomas de desconforto ocular e visual e o período de final da tarde (compreendido entre as 17 e 18h), onde geralmente a sintomatologia se intensifica.

Esta tese está dividida em sete capítulos, incluindo este, onde está descrita a motivação deste projecto. No capítulo dois faz-se a revisão bibliográfica, onde se pretende dar a conhecer as principais características da película lacrimal, a sua composição e constituição, tendo por base diversos estudos científicos publicados até ao momento. Na revisão bibliográfica dá-se particular relevância à constituição sob o ponto de vista proteico, organização trilaminar e características físico-químicas, já que estas são fundamentais para que todas as funções do filme lacrimal sejam mantidas correctamente. Uma das principais características físico-químicas abordadas é a tensão superficial, pois os seus valores parecem estar associados à estabilidade do filme lacrimal. Ainda durante a revisão bibliográfica faz-se referência à diferença de composição, entre lágrima reflexa e a lágrima basal, sendo esta última objecto de estudo no nosso projecto. Apresentam-se ainda as diferentes técnicas usada até aqui na análise lacrimal, entre elas as que avaliam a estabilidade do filme lacrimal BUT e NIBUT, e as diferentes técnicas de avaliação proteica e fisiológica, nomeadamente a electroforese, ELISA e Langmuir-Blodgett.

No terceiro capítulo, descreve-se a metodologia do exame e do material utilizados na avaliação da película lacrimal. Devido a possíveis interferências nos resultados obtidos e quantidades reduzidas de amostra lacrimal basal recolhida, numa fase inicial apresenta-se a optimização das técnicas necessárias à execução do projecto. Faz-se também uma caracterização da amostra escolhida. Posteriormente descreve-se a avaliação da estabilidade lacrimal, efectuada pelo método de NIBUT, em ambos os

olhos, realizada antes da recolha lacrimal por capilaridade. Apresenta-se a metodologia de SDS-PAGE e ELISA necessárias à caracterização bioquímica da amostra lacrimal. Por fim, é descrito também o método de Langmuir-Blodgett usado na avaliação da tensão superficial do filme lacrimal.

No quarto capítulo, apresentam-se os resultados experimentais obtidos para todas as análises realizadas ao perfil proteico que constitui a lágrima, onde se evidenciam as alterações que ocorrem no padrão diário de concentração de algumas das principais proteínas lacrimais, detectadas por SDS-PAGE, bem como os níveis de IgA e TNF- α medidos por ELISA. Apresentam-se ainda os resultados da avaliação da estabilidade lacrimal e da tensão superficial, e faz-se uma análise estatística e discussão dos resultados aqui apresentados.

No quinto capítulo, são apresentadas as principais conclusões do trabalho que indicam a ocorrência de alterações ao longo do dia, quer da composição proteica, quer da estabilidade e tensão superficial do filme lacrimal.

No sexto capítulo, faz-se um breve referência aos possíveis ajustes a efectuar na metodologia a seguir no futuro e revelam-se quais os temas que nos pareceram merecer maior aprofundamento.

No sétimo e último capítulo encontra-se a bibliografia consultada durante a realização deste trabalho.

Este estudo, no qual foi retirada lágrima não estimulada em dois períodos diferentes do dia a vários indivíduos, sendo o primeiro período compreendido entre as nove e dez horas da manhã e o segundo período entre as cinco e seis horas da tarde, tem como principal objectivo avaliar as diferenças de algumas propriedades da película lacrimal entre esses dois períodos.

Algumas destas propriedades foram avaliadas no departamento de Física da Universidade do Minho e outros parâmetros foram analisados no Departamento de Biologia desta mesma Universidade.

Capítulo 2. Revisão bibliográfica

Neste capítulo pretende-se fazer uma breve revisão bibliográfica sobre os temas que serão analisados e discutidos durante esta tese.

Na primeira parte descrevem-se as principais características do filme lacrimal no que diz respeito às suas principais funções, dinâmica, composição bioquímica e propriedades físico-químicas.

Na segunda parte aborda-se de forma resumida as várias técnicas de avaliação das características do filme lacrimal usadas na prática da Contactologia e investigação científica.

2.1 A importância do estudo do filme lacrimal

A estabilidade óptica e o normal funcionamento ocular dependem inteiramente de um aporte adequado do filme que cobre a sua superfície. Como tal, este deve ser estritamente mantido dentro de limites quantitativos e qualitativos, em termos das suas propriedades físico – químicas e da sua composição bioquímica, de forma a garantir a correcta manutenção das suas funções. As anomalias da película lacrimal que afectam os seus componentes e volume podem provocar a disfunção das pálpebras e conjuntiva e simultaneamente perda da transparência corneal. O filme lacrimal tem sido alvo de estudo em situações patológicas e durante o uso de LC. A caracterização aqui apresentada baseia-se fundamentalmente em dados retirados de alguns livros (Liotel e Morin, 2000; Larke, 2001; Berman, 2002; Sudi e Kenny, 2003; Garg *et al.*, 2008), para além da bibliografia citada no texto.

O filme lacrimal é uma película altamente organizada e especializada, que se estende por cima da conjuntiva (filme lacrimal precocular) e da córnea (filme lacrimal precorneal), que tem várias funções especializadas:

- ✓ Função óptica - é a sua principal função, garantindo uma superfície refractiva corneal de excelente qualidade óptica, mantendo o poder dióptrico da córnea (Garg *et al.*, 2008).
- ✓ Função de protecção e antibacteriana - garantir a integridade do epitélio corneal e conjuntival, impedindo a sua desidratação, e promovendo a defesa contra possíveis infecções. Para além das funções de protecção corneal, o filme lacrimal é vital na protecção de outros tecidos da superfície anterior ocular nomeadamente a conjuntiva palpebral e bulbar, de eventuais danos físicos. O filme lacrimal funciona como um veículo de entrada para leucócitos polimorfonucleares, em casos de dano. Para além de diluir e lavar a superfície ocular de agentes tóxicos ou irritantes (Berman, 2002).
- ✓ Função nutritiva - permitir o aporte de oxigénio entre o ar atmosférico e a córnea avascular (Berman, 2002).
- ✓ Função mecânica – eliminando restos celulares, resíduos metabólicos e substâncias estranhas da superfície ocular, ao mesmo tempo que garante a sua correcta lubrificação (Garg *et al.*, 2008).

2.2. Organização da película lacrimal

2.2.1 Formação, distribuição e eliminação lacrimal

A organização e conservação das propriedades do filme lacrimal são garantidas pelo sistema lacrimal, um complexo sistema de secreção, excreção e distribuição, que se pode observar na figura 2.1.

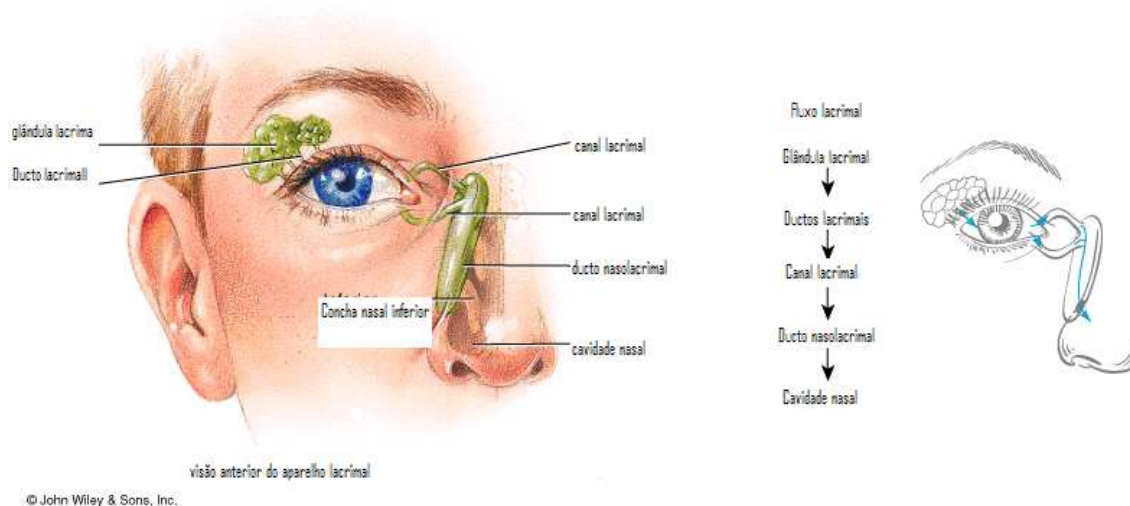


Figura 2.1 - Sistema lacrimal. (Imagem retirada em Ihwl.lhsa.com)

A componente secretora compreende a glândula lacrimal, tecido glandular lacrimal acessório, glândulas sebáceas das pálpebras, células caliciformes e outros elementos secretores de mucina da conjuntiva (Berman, 2002), como esquematizado na figura 2.2. A glândula lacrimal principal é inervada pelas fibras do parassimpáticas e a secreção controlada na sua maioria pelas fibras colinérgicas desse sistema (Berman, 2002).

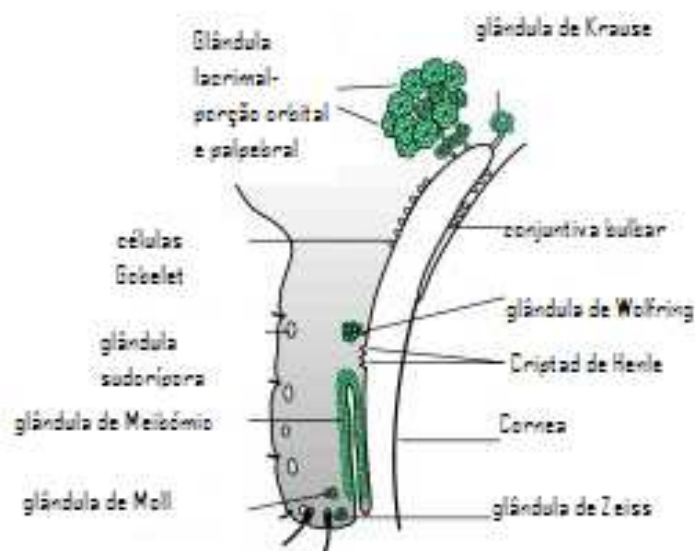


Figura 2.2 - Representação das glândulas responsáveis pela secreção do filme lacrimal. (Imagem retirada em img.tfd.com/ElMill/thumb/F0G-02-S2958.jpg)

O volume lacrimal varia entre os 5 a 10 μ l, com uma velocidade de secreção de 1 - 2 μ l/minuto, sendo 95% desta secreção efectuada pela glândula lacrimal, e em menor parte pelas glândulas caliciformes e glândulas acessórias da conjuntiva (Sudi e Kenny, 2003).

A distribuição lacrimal está a cargo dos movimentos palpebrais e oculares que estendem uniformemente a delgada película lacrimal. Essa película pode ser dividida em quatro partes, relativamente à sua localização:

- ✓ Película lacrimal marginal – ao longo das zonas húmidas palpebrais e que se estende por trás da camada lipídica secretada pelas glândulas tarsais.
- ✓ Porção que cobre a conjuntiva tarsal
- ✓ Porção que cobre a conjuntiva bulbar
- ✓ Película precorneal – que cobre a córnea

Considera-se que as porções marginal, palpebral e conjuntival formam a película lacrimal preocular.

A eliminação lacrimal é essencialmente realizada pelo movimento de pestanejo e que favorece a drenagem (Sudi e Kenny, 2003). Em condições normais a lágrima após a entrada nos pontos lacrimais ingressa nos canalículos superior e inferior por capilaridade e alguma sucção. Posteriormente flui até ao saco lacrimal, como se pode observar esquematicamente na figura 2.1. Uma pequena percentagem da eliminação (10 a 25%) deve-se ao fenómeno de evaporação.

A velocidade de evaporação é baixa devido à superfície lipídica protectora mas na ausência ou disfunção desta camada lipídica a velocidade de evaporação é incrementada em vinte vezes. Por definição, uma película é uma camada delgada que pode permanecer em sentido vertical sem fluxo gravitacional apreciável e a película lacrimal satisfaz muito bem este critério (Sudi e Kenny, 2003).

2.2.2 Organização trilaminar do filme lacrimal

O filme lacrimal é constituído por três camadas distintas, a camada superficial lipídica, a camada intermédia aquosa e pela camada posterior de mucina, como se pode observar na figura 2.3.

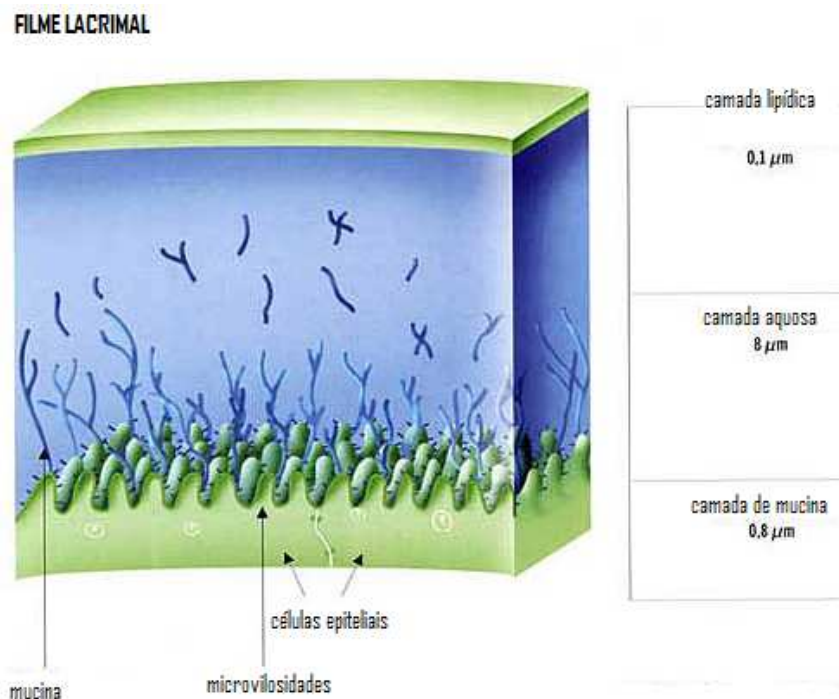


Figura 2.3 - Estrutura trilaminar do filme lacrimal. (Imagem retirada em www.lea-test.fi/en/eyes/images/pict7b.jpg)

2.2.2.1 A camada lipídica

A camada lipídica localiza-se na superfície de contacto entre o ar e a lágrima sobre a camada aquosa. É composta por uma monocamada lipídica polar com características surfactantes e por uma fase não polar (James e Ward, 2001) que retarda a transmissão do vapor de água. As fases lipídicas dependem ambas do tipo de lipídios, ácidos gordos e álcoois que as constituem. É secretada em grande parte pelas glândulas de Meibomio, localizadas no bordo palpebral e também pelas glândulas acessórias de Zeiss e Moll. A sua espessura está dependente da abertura palpebral mas geralmente varia entre os 0,1 e 0,2 µm (James e Ward, 2001).

Esta camada tem variadas funções lacrimais: reduz a velocidade de evaporação da camada lágrima subjacente; aumenta a tensão superficial e ajuda na estabilidade vertical, evitando o derrame sobre a pálpebra inferior; Lubrifica as pálpebras enquanto estas deslizam sobre a superfície ocular (Garg *et al.*,2008) e funciona como uma importante barreira à entrada de microorganismos e matéria orgânica como o pólen (James e Ward ,2001)

2.2.2.2 A camada aquosa

A camada aquosa é a camada intermédia, localiza-se entre a camada lipídica e a de mucina, é produzida pela glândula lacrimal principal e pelas glândulas acessórias de Wolfring e Krause. Representa praticamente a totalidade da espessura do filme lacrimal, cerca e 6,5 – 10 μm (Garg *et al.*, 2008).

Esta camada contém sais inorgânicos, proteínas aquosas, enzimas, glicose, ureia, metabolitos, electrólitos, glucoproteínas e biopolímeros superficiais activos. A captação de oxigénio através da película lacrimal é essencial para as actividades metabólicas da córnea (Garg *et al.*, 2008). Esta camada tem quatro funções principais: aporte de oxigénio atmosférico ao epitélio corneal; presença de substâncias antibacterianas com a lactoferrina e lisozima, o que pode explicar a maior susceptibilidade a infecções no síndrome de olho seco; manutenção da superfície óptica mais lisa, eliminando pequenas irregularidades na superfície corneal; e por último elimina os detritos existentes na córnea e conjuntiva (Sudi e Kenny, 2003).

2.2.2.3 A camada posterior de Mucina

A camada de mucina é a camada mais interna da película lacrimal, extremamente fina e que consiste numa camada mucoíde formada por mucopolissacárideos de alto peso molecular, os GP1, GP2 e GP3M (Liotel e Morin, 2000). A composição dos seus açúcares foi determinada por cromatografia em fase gasosa e manifesta na sua constituição a presença de unidades de galactose, glucose, galactosamina, e

glucosamina. O esqueleto peptídico das moléculas de mucina contem elevadas taxas de treonina, serina, glutamina e glicina, as suas ligações bem como as cadeias laterais de hidratos de carbono revelam elevadas percentagens de ligações entre galactosamina e ácido neuramínico. Esta camada é produzida pelas células caliciformes da conjuntiva e pelas criptas de Henle e glândulas de Manz. Tem uma espessura de apenas 0,02 a 0,04 μm , sobre as microvilosidades (Liotel e Morin, 2000). Estende-se sobre a superfície epitelial da córnea e da conjuntiva, tornando-as hidrófilas e adoptando o aspecto de microvilosidades das células epiteliais que cobre. Desta forma, a camada de mucina, que é uma glucoproteína que converte uma superfície hidrófoba numa superfície hidrófila, o que permite o correcto humedecimento do epitélio.

2.3 Composição do filme lacrimal

As lágrimas são constituídas por cerca de 98,2% de água e 1,8% de constituintes sólidos (Liotel e Morin, 2000). A alta quantidade de água reflete-se na necessidade de lubrificar a conjuntiva e superfície da córnea. É importante referir que a taxa de evaporação lacrimal pode influir na sua concentração. A velocidade de evaporação é de aproximadamente $4.1 \times 10^{-7} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$, entre pestanejos de 10 segundos. A espessura lacrimal entre pestanejos pode diminuir 0,1 mm, o que determina um aumento da concentração de solutos de 20%.

As primeiras análises de composição lacrimal iniciaram-se já no século XVIII. Em 1791 Fourcroy e Van Que Lin efectuaram a primeira análise química lacrimal. Uma análise mais detalhada foi posteriormente efectuada em 1992 por Fleming (Garg *et al.*, 2008) em, que descobriu as propriedades antibacterianas da lisozima inicialmente no muco nasal e posteriormente nas próprias lágrimas. Os estudos imunoelectroforéticos (Peter e Paul, 1983) revelaram que para além de electrólitos também lípidos, proteínas, enzimas, metabolitos e iões de hidrogénio fazem parte da constituição lacrimal. Uma constituição mais detalhada pode ser observada na tabela 2.1.

Tabela 2.1- Composição do filme lacrimal (Garg *et al.*, 2008)

Componente lacrimal		Quantidade
Composição geral da lágrima	água	98,2 g/100ml
	Sólidos(total)	1,8 g/100ml
	Cinzas	1,05g/100ml
Electrolitos	Sódio	120 -170 mmol/l
	Potássio	26 -42 mmol/l
	Cálcio	0,3 – 2,0 mmol/l
	Magnésio	0,5 – 1,1 mmol/l
	Cloro	120 -135 mmol/l
	Bicarbonato	26 mmol/l
Antiproteínases	α 1- antitripsina	0,1 -3,0 mg%
	α - antiquimiotripsina	1,4 mg%
	Inibidor de inter- α -tripsina	0,5 mg%
	α 2-macroglobulina	3-6 mg%
Substâncias Azotadas	Proteínas totais	0,0668 - 0,800 g/100 ml
	Albumina	0,392 g/100 ml
	Globulinas	0,2758 g/100 ml
	Amoníaco	0,005 g/100 ml
	Ácido úrico	0,04 mg/100 ml
	Nitrogénio Total	158 mg/100 ml
	Nitrogénio não proteico	51 mg/100 ml
Hidratos de Carbono	Glucose	2,5 mg/100 ml
Esteroides	Colesterol e derivados	8 - 32 mg/100 ml
Vários	Ácido cítrico	0,6 mg/100 ml
	Ácido ascórbico	0,14 mg/100 ml
	Lisozima	1 - 2 mg/100 ml
	Ácido láctico	1 -5 mmol/L
	Prostaglandina	75 pg/ml
	Catecolamina	300 pg/ml

2.3.1 Lípidos

Os lípidos estão presentes somente na camada lipídica do filme lacrimal. Estudos cromatográficos revelaram a presença de praticamente todas as classes de lípidos, principalmente de ésteres de cera e glicerol, bem como triglicerídeos. Em menor concentração encontram-se diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos gordos livres, colesterol e fosfolípidos. As concentrações de colesterol lacrimal são equivalentes às encontradas no sangue (Garg *et al.*, 2008).

2.3.2 Proteínas

O conteúdo proteico total da lágrima varia dos 6 aos 10 mg por ml (Gachon, 1982). É possível encontrar cerca de 60 componentes e estas formam a primeira linha de defesa contra infecções externas e parecem ser mais eficazes que os anticorpos produzidos pela via sistémica. O conteúdo proteico lacrimal difere do sanguíneo. As proteínas lacrimais classificam-se em dois grupos: proteínas do grupo A e proteínas do grupo B.

2.3.2.1 As proteínas do grupo A

As proteínas do grupo A são similares às proteínas séricas, que se encontram em baixa concentração e representam 15% das proteínas totais lacrimais. Algumas destas estão sempre presentes no fluido lacrimal (Albumina, IgG, α -L-antitripsina, Transferrina, α -L-antiquimiotripsina, e β -2 macroglobulina), outras aparecem esporadicamente como é o caso da ceruplasmina, hepatoglobina e α -2 glucoproteína (Garg *et al.*, 2008).

2.3.2.2 As proteínas do grupo B

As proteínas do grupo B são específicas da lágrima e sintetizadas pela glândula lacrimal, como é o caso da proteína de migração rápida (RMP) e outras proteínas que por vezes, também são encontradas em secreções externas, nomeadamente, a Lisozima, Lactoferrina e IgA (Garg *et al.*, 2008).

- A **Albumina** representa cerca de 60% das proteínas lacrimais, tal como no plasma. A albumina lacrimal tem polimorfismo genético, é uma fracção proteica singular, tem um tamanho teórico de 68 kDa e deriva do plasma. A albumina lacrimal do ponto de vista electroforético é uma pré-albumina, que migra até uma posição similar à da pré-albumina sérica. Tem uma concentração que depende da estimulação lacrimal e que varia entre os 20 – 30 mg/ml. Tem como função o transporte de ácidos gordos livres estabelecendo a pressão osmótica (Farris, 1985)
- A **Lisozima**, descoberta por Fleming tem um peso teórico de 14 kDa, representa entre 20 e 40 % das proteínas lacrimais totais (Farris, 1985), deriva da glândula lacrimal e é uma enzima anti-bacteriana do sistema imunitário inato, com capacidade de lisar as paredes bacterianas. A sua concentração lacrimal é muito superior na lágrima comparativamente a outro fluido orgânico, 0,83 a 2,06 g/ml (Larke, 2001). É uma enzima proteolítica de cadeia longa e alto peso molecular produzida nos lisossomas, actua nas paredes bacterianas clivando o componente polissacarideo e a sua actividade é óptima a pH de 5,2. Contudo a sua eficácia é superior em baixas concentrações de sal uma vez que aumenta a sua solubilidade. Em pacientes com síndrome de Sjogren os níveis de lisozima estão diminuídos, tal como em infecções por vírus herpes e desnutrição infantil (Larke, 2001).
- A **Lactoferrina** representa cerca de 25 % das proteínas totais. É uma proteína transportadora de ferro, pois tem a capacidade de fixar o ferro (FeIII). Comparativamente a outras proteínas transportadoras de ferro, apresenta uma capacidade de fixar e transportar o ferro 3000 vezes superior, daí a sua importância. Pertence ao sistema inato, tem um peso teórico de 82 kDa, é inibidora do crescimento bacteriano e tem propriedades anti-inflamatórias. Estas propriedades podem dever-se à sua capacidade de fixar o ferro, um metal essencial ao metabolismo microbiano. A lactoferrina pode sofrer acção de várias proteases (Farris, 1985).

- A **Ceruplasmina** é uma proteína transportadora de cobre e na electroforese a sua velocidade de migração é diferente da Ceruplasmina sérica (Larke, 2001).
- As **Imunoglobulinas** representam um dos cinco maiores grupos de proteínas. Tal como em outras superfícies expostas, a IgA é a principal imunoglobulina secretada no filme lacrimal com uma concentração de cerca 24 mg/100ml, sendo sintetizada pelos plasmócitos intersticiais (Farris, 1985; Robert *et al.*, 1992). A IgA compreende uma pequena fracção que procede do sector vascular mediante passagem da barreira hematolacrimal, mas a sua maioria é sintetizada nos próprios tecidos lacrimais (Robert *et al.*, 1992). A IgA é um dímero formado por duas unidades de IgA e um componente secretor. Associada à camada de mucina representam uma barreira contínua para todos os microorganismos externos (Liotet, 2000). A IgA secretada pela glândula lacrimal é mais efectiva que a IgA sistémica no combate a microorganismos externos, podendo mesmo combater e neutralizar determinados vírus (Larke, 2001).
- A **Lipocalina** tem um tamanho teórico de 17kDa e tem a capacidade de se ligar a moléculas pequenas hidrofóbicas tais como o retinol para promover o seu transporte (Farris, 1985). Para além disso, pensa-se estar directamente relacionada com a tensão superficial do filme lacrimal e consequentemente, com a taxa de evaporação deste, rotineiramente avaliada pelos vários testes de ruptura lacrimal.
- O **TNF- α** é uma citocina pró-inflamatória, que pode aparecer por alteração conjuntival, ou dano epitelial. Alguns estudos revelam que a sua concentração se encontra aumentada em situações de alergias oculares, embora a sua gama de concentração lacrimal seja pequena, na ordem dos 18 a 1,5 pg/ml (Vesaluoma *et al.*, 1999). Desempenha um papel fundamental no processo inflamatório e apoptose, sendo expressa por várias células humanas entre elas neutrófilos, mastócitos, adipócitos, macrófagos e células NK, T e B. Durante a resposta inflamatória é responsável pelo fenómeno de quimiotaxia, regulando a

infiltração leucocitária. São-lhe também atribuídas funções de regulação no desenvolvimento do tecido linfóide, e diferenciação das células hematopoiéticas. Esta citocina está associada a numerosos processos patofisiológicos e algumas desordens incluindo a asma, diabetes tipo II, doença de Crohn's e artrite reumatóide (Vesaluoma *et al.*, 1999). Alterações nesta citocina, bem como nos seus receptores, pode conduzir a uma maior susceptibilidade infecciosa (Peschon *et al.*, 1998; Wellmer *et al.*, 2001; Kasahara *et al.*, 2003).

2.4 Propriedades físico-químicas do filme lacrimal

2.4.1. Índice de refração

O índice de refração lacrimal é muito semelhante ao da córnea e situa-se entre os de 1,366 e 1,367 (Liotet e Morin, 2000).

2.4.2 . pH

O pH fisiológico da lágrima encontra-se numa gama de valores entre os 7,3 e 7,7 com um valor médio ligeiramente alcalino de 7,4. Este pode sofrer variações importantes, pode descer para os 6,5 após um período prolongado de fecho palpebral, como por exemplo durante o sono (Liotet e Morin, 2000).

2.4.3. Pressão osmótica

A pressão osmótica está dependente sobretudo da presença dos electrólitos e situa-se em torno dos 305 mOsm/kg o que equivale à presença de cloreto de sódio de 0,95%. Esta pode também diminuir após um período prolongado de fecho palpebral (Gard *et al.*, 2008).

2.4.4. Viscosidade

O filme lacrimal tem uma viscosidade de 0,3 dina/cm (Liotet e Morin, 2000). Esta propriedade é importante na lágrima por actuar como lubrificante.

2.4.5. Condutividade térmica

O coeficiente K da fórmula de Fourier é de 2144×10^{-5} (Liotet e Morin, 2000).

2.4.6. Temperatura

A temperatura do filme lacrimal varia entre os 30 a 35 °C. Com os olhos abertos, sem pestanejo, a temperatura diminui 1 °C, com os olhos fechados esta aumenta 0,5 °C. Estudos termográficos revelam ainda que a zona da córnea é a mais fria da superfície ocular (Liotet e Morin, 2000).

2.4.7. Tensão superficial

A lágrima, tal como todos os líquidos, tende a adoptar uma forma que minimize a sua área de superfície, numa tentativa de manter as moléculas com o maior número possível de vizinhos semelhantes. As gotas dos líquidos tendem a assumir a forma esférica, pois a esfera é a forma com a menor razão superfície/volume. Entretanto, podem existir outras forças presentes no sistema que competem contra a formação de superfícies ideais, tais como a força gravitacional, que pode achatar as esferas em formas mais planas (Carvalho, 2006). O trabalho necessário para se mudar a área de superfície δ de uma amostra por uma quantidade infinitesimal $d\delta$ pode ser escrito como:

$$d\omega = \gamma d\delta \quad \text{equação 1}$$

O coeficiente γ é chamado de **tensão superficial**; as suas dimensões são energia/área ($d\omega/d\delta$, ou seja, J/m²). Entretanto, os valores de γ são geralmente expressos em newton por metro (N.m⁻¹, uma vez que 1 J = 1 N.m).

A tensão superficial resulta de interacções moleculares. As moléculas que constituem um líquido possuem um determinado grau de atracção entre si, designado por coesão, que depende das propriedades da própria substância. As interacções moleculares são equilibradas por forças atractivas de equilíbrio em todas as direcções. No entanto, existem moléculas expostas a um desequilíbrio de forças, ou seja as moléculas que se encontram na interface ar/líquido sofrem um atracção superior na fase líquida relativamente à fase gasosa, o que espontaneamente minimiza a área a contrair, como se pode observar na figura 2.4. Nesta situação, existe um excesso energético livre à superfície que pode ser quantificado como uma medida de força por unidade de comprimento (Carvalho, 2006).

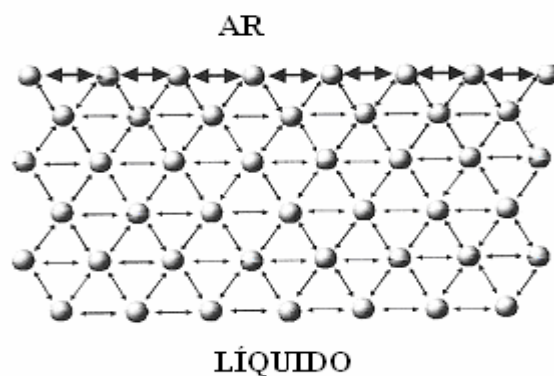


Figura 2.4 - Ilustração esquemática da interacção de moléculas na interface e no interior (Carvalho, 2006)

A tensão superficial pode também ser considerada como uma medida da energia coesiva presente na interface. Líquidos polares como a água têm forte interacção molecular e consequentemente alta tensão superficial. Qualquer factor que faça diminuir esta interacção faz diminuir a tensão superficial, como é o caso das proteínas existentes no filme lacrimal. Em condições de volume e temperatura constante, o trabalho para a formação da superfície pode ser relacionado com a mudança na energia de Helmholtz (A), e pode ser escrito como:

$$dA = \gamma d\delta \quad \text{equação 2}$$

Como a energia de Helmholtz diminui ($dA < 0$) quando a superfície diminui ($d\delta < 0$), as superfícies tem uma tendência natural para se contrair. Esta é a base do fenómeno da capilaridade (Minatti, 2007).

2.4.7.1 Formação da película lacrimal

Diversas actividades realizadas no corpo humano só são possíveis graças a propriedades especiais de anfifílicos que, associados a proteínas, desempenham diversas funções vitais. São os anfifílicos que preservam a humidade constante no tecido da córnea.

A córnea, tal como foi referido anteriormente, é coberta com um filme muito fino, o qual é constituído por uma fase aquosa, de aproximadamente 10^{-3} cm de espessura, com uma camada de anfifílicos e mucina adsorvida na camada externa (interface água-ar) e com uma camada de mucina no lado interno do filme. A camada externa do filme é hidrofílica, permitindo o espalhamento efectivo da lágrima, mantendo a superfície ocular sempre hidratada.

A formação e estabilidade do filme lacrimal dependem das propriedades físicas da lágrima, nomeadamente da tensão superficial (Tiffany, 2006). Ainda que a área de exposição seja ampla, aproximadamente $1-3 \text{ cm}^2$, é muito fina, as forças gravitacionais que promovem a drenagem lacrimal são menores que as forças capilares e por isso são dominantes na manutenção da película lacrimal sobre a superfície ocular (King-Smith *et al.*, 2004). A película forma-se continuamente após cada ciclo de pestanejo, um ciclo composto pela fase de compressão, durante o fecho palpebral e uma fase de abertura, onde se obtém a nova película lacrimal a partir dos meniscos ao ampliar a fenda palpebral (Creech *et al.*, 1998). Esta fase de abertura e extensão está limitada segundo a equação de Radke:

$$h = 2.123 R (\mu U / \gamma)^{2/3} \quad \text{equação 3}$$

Onde h representa a espessura da película lacrimal, R o raio de curvatura do menisco, γ a tensão superficial, μ a viscosidade lacrimal e U a velocidade de pestanejo. Ainda que

o perfil possa variar, o menisco é sempre côncavo. Segundo a equação de Young-Laplace (equação 4) existe uma diferença de pressão ao longo desta superfície que tende em “aspirar” o fluido desde a película lacrimal até ao menisco lacrimal que se forma entre a superfície da pálpebra e da conjuntiva bulbar e que está presente ao longo das margens inferior e superior das pálpebras.

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{R}$$

Equação 4

Onde ΔP representa a diferença de pressão entre as superfícies, γ a tensão superficial e R o raio de curvatura do menisco.

2.4.7.2 Papel das proteínas na tensão superficial

Um estudo anterior (Nagyova e Tiffany, 1999) revelou que as soluções proteicas têm tensões superficiais menores que as da água (73 mN/m) ou soro salino. Isto é uma realidade para as soluções que contêm na sua constituição a grande maioria das proteínas lacrimais, onde a tensão superficial ronda os 58.2 mN/m, estejam as proteínas presentes de forma individual ou em combinação. De facto, a tensão superficial lacrimal é ainda menor (43-46mN/m), do que a de soluções que contenham somente as ditas proteínas lacrimais, o que pode ser explicado pela presença de outras substâncias, tais como os lípidos.

Tiffany (2006) demonstrou que a extracção dos lípidos da lágrima faz subir a sua tensão superficial até ao valor que esta apresentaria se fosse constituída somente por proteínas e que a adição posterior dos mesmos lípidos restaura o valor de tensão superficial lacrimal. A lipocalina é a única proteína lacrimal importante com capacidade de unir os lípidos. Uma vez que estes não se encontram livres na lágrima, o complexo lipocalina – lípido parece ser de extrema importância, ainda que se desconheça se o valor de tensão superficial implica somente os lípidos (com a proteína como transportador) ou se implica o complexo formado entre eles. Não se conhece a totalidade dos lípidos

envolvidos no processo, contudo pode incluir componentes não secretados pelas glândulas de Meibomio.

Ainda segundo Tiffany *et al* (1989) existe um aumento da tensão superficial da lágrima em pacientes de olho seco, e que em idades avançadas existe uma diminuição de proteínas lacrimais acompanhada também de aumento de tensão superficial, embora a lipocalina não esteja afectada.

2.5 Lágrima basal versus reflexa

A secreção lacrimal é dividida em basal e reflexa. A secreção basal é a produção, não estimulada, constante de lágrima, cujo volume produzido normalmente durante o dia, é de 0,5 a 1 ml, suficiente para manter o olho húmido e lubrificado. O volume produzido é menor à noite. A secreção reflexa é a produção de grande volume de lágrima e ocorre em resposta à estimulação táctil, química ou luminosa da córnea e/ou conjuntiva. A secreção reflexa ocorre em ambos os olhos, mesmo que apenas um tenha sido estimulado (Sudi e Kenny, 2003).

Para além das quantidades de volume lacrimal produzido, diferir do processo basal para o reflexo, estudos realizados anteriormente (Roderick e Snyder, 1990; Fullard e Tucker, 1991; Robert *et al.*, 1992; Sonoda *et al.*, 2006) revelam que ocorrem diferenças significativas a nível da produção de algumas proteínas, nomeadamente citocinas, que desempenham um papel importantíssimo ao longo do desenvolvimento das patologias oculares. No estudo realizado por Sonoda *et.al* (2006) verificou-se que as concentrações de várias interleucinas, nomeadamente IL-1b, IL-6, IL-10, IL-12p70e TNF- α não eram significativamente distintas entre lágrima reflexa e basal, contudo o mesmo não sucedia com a IL-8, que sofria um decréscimo significativo na lágrima reflexa quando comparada com a basal do mesmo olho. Para Robert *et al.* (1992), a lágrima reflexa tem uma origem neurológica passível de ser induzida composta quase exclusivamente por lisozima, lactoferrina, pré-albumina. Já a lágrima não reflexa é composta basicamente por secreção ocular e tem como principal componente a IgA.

No estudo de Fullard e Tucker (1991) as amostras lacrimais foram recolhidas inicialmente de forma não estimulada e, posteriormente, recolhidas com o aumento progressivo de estimulação. Das 13 proteínas estudadas por *Size Exclusion High Performance Liquide Chromatography* (SE-HPLC) e *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), 9 delas revelaram uma maior concentração na lágrima basal comparativamente com a reflexa. A concentração de IgM e IgA diminuíram progressivamente ao longo da ordem temporal de recolha. Os níveis de IgG, albumina e transferrina sofreram um decréscimo abrupto na comparação de amostra lacrimal não estimulada para a primeira recolha de lágrima estimulada. Já a lactoferrina, pré-albumina e lisozima permaneceram sem diferenças significativas entre lágrima não estimulada e estimulada.

O estudo de Roderick e Snyder (1991) comparou a quantidade de proteínas totais obtidas na lágrima basal e reflexa de um mesmo indivíduo por *High Performance Liquide Chromatography* (HPLC) e chegou à conclusão que a razão de proteínas totais presente na lágrima basal relativamente à reflexa era de 1,71. Algumas das proteínas principais foram determinadas também por outros métodos nomeadamente ELISA e observou-se que a principal diferença se encontra ao nível dos níveis de IgA secretada, que são muito superiores em lágrimas não estimuladas, que as de carácter reflexo. Isto pode ter várias explicações, sendo uma delas, o facto da quantidade de IgA secretada ser independente do volume lacrimal produzido (Burgess e Kelly, 1987). O mesmo sucede no caso da IgM, e nas principais proteínas sanguíneas, IgG, transferrina e albumina sérica, que são muito superiores em lágrimas não estimuladas. Já no que diz respeito aos níveis das proteínas lacrimais primárias, nomeadamente lactoferrina, pré-albumina lacrimal específica e lisozima, não se observam diferenças significativas, tal como se verifica no estudo de Fullard e Tucker (1991), contudo existem informações de que a lisozima pode sofrer um ligeiro aumento na lágrima reflexa (Garg *et al.*, 2008).

Todos estes estudos indicam que a razão de volume lacrimal influencia fortemente o perfil lacrimal proteico, pelo que não deve ser ignorada quando se pretende estudar o perfil bioquímico lacrimal.

2.6 Avaliação da película lacrimal

Na prática diária de Contactologia avaliam-se aspectos fundamentais da película lacrimal, nomeadamente parâmetros de quantidade de lágrima basal secretada e qualidade da camada lipídica e a correcta presença dos seus componentes deve ser monitorizada, independentemente do uso ou não de LC.

Estes parâmetros podem ser monitorizados recorrendo a testes simples existentes na prática de Contactologia como o teste de Shirmer, Vermelho de Fenol, avaliação do Tempo de Ruptura Lacrimal ou Break Up Time (BUT) e do Tempo de Ruptura Lacrimal não Invasivo (NIBUT) e ainda por observação da camada lipídica. Para além dos parâmetros clínicos acima mencionados deve ser realizada uma cuidadosa anamnese de forma a despistar problemas oculares ou sistémicos associados.

Existem ainda formas mais sensíveis, mas também menos comuns de monitorizar o filme lacrimal. O seu menor uso prende-se sobretudo com a sua complexidade, como é o caso das análises bioquímicas laboratoriais, que avaliam a composição e propriedades físico-químicas da lágrima, nomeadamente tensão superficial, pH, osmolaridade, culturas microbianas e determinação de quantidades de elementos proteicos por ELISA ou determinação do perfil proteico por electroforese em gel.

2.6.1 Provas de determinação do tempo de ruptura lacrimal

Entre pestanejos, com o olho aberto, o componente aquoso evapora-se lentamente, aproximando a camada lipídica da camada de mucina. O filme permanece estável enquanto a separação entre as duas camadas é adequada, caso contrário os lípidos difundem-se, então, pelo que restou da camada aquosa e atingem a camada mucosa, formando uma área hidrofóbica, que repele a porção aquosa (mancha seca), como é visível na figura 2.5.

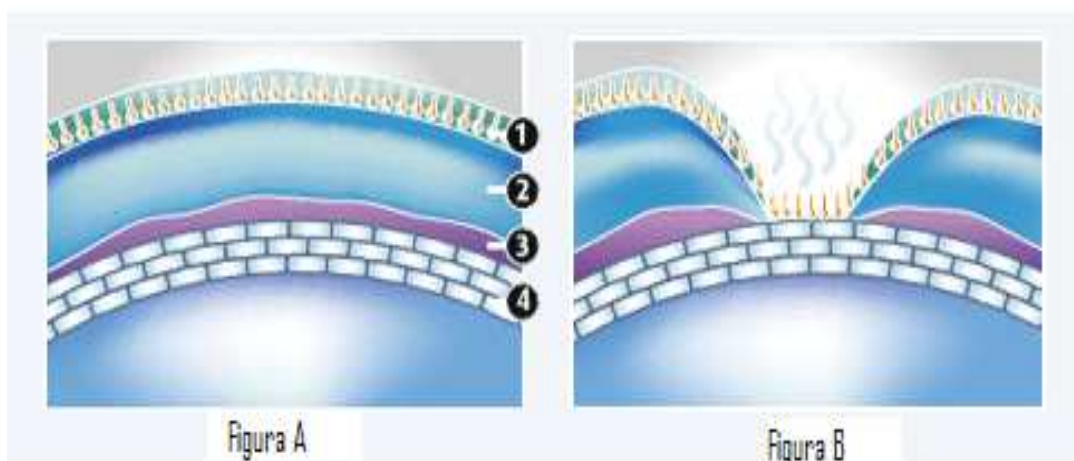


Figura 2.5 - Observação da ruptura lacrimal. Organização trilaminar do filme lacrimal (A) e momento de ruptura lacrimal (B). 1-Camada lipídica, 2-Camada aquosa, 3-Camada de mucina, 4-Córnea. www.ursapharm.in

As tensões originadas entre as diferentes substâncias que compõem o filme, juntamente com a evaporação mais acelerada nas zonas de ruptura determinam que a instabilidade do filme lacrimal se transfira para as restantes zonas da superfície ocular (Méijome, 2005).

Geralmente este período é inferior durante o uso de lentes de contacto, uma vez que a sua colocação no olho afecta a estruturação da película lacrimal, diminuindo a distância entre a camada lipídica e de mucina. Este período, desde o pestanejo até a formação da mancha seca, chama-se tempo de rotura lacrimal (TRL), pode ser avaliado recorrendo a diversos métodos quer de forma invasiva (BUT) quer de forma não invasiva (NIBUT)

2.6.1.1 BUT

Os testes BUT na sua generalidade consistem na observação, através de um biomicroscópio, da distorção do filme lacrimal de forma invasiva por instilação de fluoresceína. A fluoresceína solubiliza a camada lipídica pelo que qualquer ruptura é visível como uma mancha preta, como observado na figura seguinte (figura 2.6).

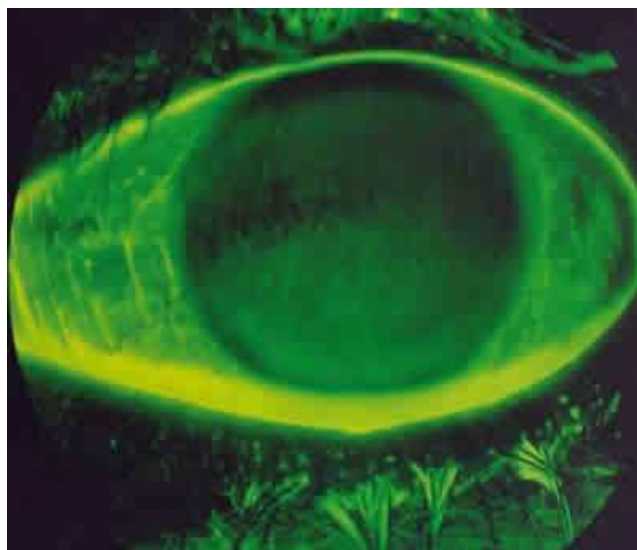


Figura 2.6. Observação da superfície corneal após instilação de Fluoresceína (teste BUT).

Contudo, a estabilidade lacrimal observada por este método invasivo é geralmente afectada pela quantidade de fluoresceína instilada. (Mengher *et al.*, 1985; Patel *et al.*, 1985) mostraram que a instilação tópica de fluoresceína diminui a estabilidade do filme lacrimal.

2.6.1.2. NI BUT

O teste não invasivo NIBUT pode ser determinado por observação de miras projectadas na superfície corneal. É possível detectar a distorção ou descontinuidade das miras projectadas quando se dá a ruptura lacrimal e assim medir o tempo de ruptura lacrimal de forma não invasiva. Este método foi testado usando vários instrumentos existentes no mercado sendo um dos mais utilizados; o Tearscope Plus (Cho *et al.*, 2004).

O formato e cor das miras varia de acordo com o instrumento utilizado, embora o seu princípio de funcionamento seja semelhante. Contudo o tamanho das miras, bem como a superfície corneal coberta por estas, difere desde instrumentos que avaliam 3 mm centrais da córnea (Queratómetro) até outros que permitem avaliar 70 a 80% da superfície, como é o caso do Tearscope. Este factor pode gerar diferenças de valores de

NIBUT determinados quando se comparam os vários instrumentos, já que o filme localizado na superfície periférica tem geralmente um tempo de ruptura inferior.

Outro factor que também pode influenciar estes valores consiste no facto dos critérios usados na definição do ponto em que se considera ser a ruptura lacrimal, uma vez que o ponto de distorção das miras, descontinuidade da imagem reflectida, desfocagem das miras depende do instrumento utilizado (cho *et al.*, 2004).

O fundo em que a mira é projectada pode ser branco, como no Tearscope ou preto como no caso do Queratómetro. Contudo, após a comparação entre estes instrumentos, verifica-se que não existe diferença estatisticamente significativa, embora seja recomendado usar fundos pretos em pacientes com íris escuras uma vez que torna mais visível a mira projectada (cho *et al.*, 2004).

Um tempo de ruptura lacrimal inferior a 10 s em pacientes não usuários de LC é geralmente associado à síndrome de olho seco. Já no que diz respeito ao NIBUT, este não deve ser inferior a 20 s. Caso o NIBUT se revele inferior ao valor estabelecido como critério, deve ser monitorizado cuidadosamente, embora o NIBUT não possa por si só factor de previsão para o sucesso de usuários de LC.

2.6.1.2.1 O Tearscope plus

É um instrumento portátil, que pode ser acoplado à lâmpada de fenda (figura 2.7), permite a visualização de estruturas superficiais ao mesmo tempo que avalia de forma não invasiva o tempo de ruptura lacrimal, medindo e observando o filme lacrimal pré-ocular (POTF) e o filme lacrimal pré-lente (PLTF), o que pode permitir o seu uso na avaliação lacrimal de rotina em usuários de LC (Meijome, 2005). Este instrumento usa um cátodo de luz fria que não provoca secura artificial do filme lacrimal durante o exame (Guillon, 1998).



Figura 2.7. Tearscope Plus (Keeler instruments)

A observação do POTF compreende cinco etapas:

- 1- Observação e quantificação da camada lipídica
- 2- Observação dos acúmulos lacrimais
- 3- Observação da sequência de pestanejo
- 4- Medida do NIBUT
- 5- Observação da glândula de Meibomio

A determinação do NIBUT pode ser efectuada directamente por observação, sem recurso a qualquer mira projectada. Contudo, quando a camada lipídica tem pouca reflectividade, ou na presença de uma íris clara, as observações de ruptura tornam-se mais difíceis e requerem o uso de uma grelha auxiliar impressa em acetato, que será posteriormente reflectida (figura 2.8).

Trata-se de uma medida indirecta, já que o que se observa é distorção do padrão da grelha produzido enquanto a superfície da córnea actua como um espelho.



Figura 2.8. Miras projectadas sobre a córnea com o Tearscope

2.6.2 Provas de determinação da tensão superficial pelo método de Langmuir Blodgett

Muitos dos métodos de medição da tensão superficial requerem grandes quantidades de lágrima, o que é particularmente difícil, sobretudo em pacientes de olho seco. Outros métodos já usados, apesar de trabalharem com volumes menores têm sido alvo de críticas pela sua incapacidade de garantir leituras. Um método amplamente utilizado (Gesser, 2000; Tiffany, 2006) consiste em colocar uma pequena gota de lágrima numa superfície definida, geralmente uma lente de contacto e medir o seu ângulo de contacto em equilíbrio. Uma outra técnica que permite a medição da tensão superficial lacrimal com volumes reduzidos, é o método de Langmuir–Blodgett.

Como se referiu anteriormente a interface ar/água possui um excesso de energia livre originada pela diferença de envolvente das moléculas da superfície e das do interior. Esta energia livre interfacial pode medir-se através de medidas da tensão superficial, γ . A tensão superficial da água é cerca de 73mN/m a 20° C, que é um valor extremamente elevado comparado com outros líquidos e, conseqüentemente faz da água uma excelente subfase para estudos de monocamadas.

Quando uma solução que contenha um composto anfifílico, num solvente insolúvel em água é colocada na superfície da água com uma micro-seringa, a solução espalha-se rapidamente para cobrir a área disponível. À medida que o solvente evapora, forma-se uma monocamada. Quando a área disponível para a monocamada é grande, a distância entre moléculas adjacentes é grande e a interacção entre elas é fraca. A monocamada pode ser então vista como um gás bidimensional. Nestas condições a monocamada tem pequena influência na tensão superficial da água. Se a área superficial de uma monocamada for reduzida por um sistema de barreiras, como ilustrado na figura 2.9 a concentração superficial de moléculas anfifílicas aumenta, o que faz com que a tensão superficial diminua, afastando-se do valor em água. Este afastamento aumenta então com a aproximação das moléculas anfifílicas na superfície, pelo que, em analogia com o aumento de pressão de um gás que se verifica com a diminuição do seu volume, se designa por pressão superficial, Π , é dada pela seguinte relação:

$$\Pi = \gamma - \gamma_0 \quad \text{equação 5}$$

Onde γ é a tensão superficial na ausência de monocamada e γ_0 é a tensão superficial com a monocamada presente.

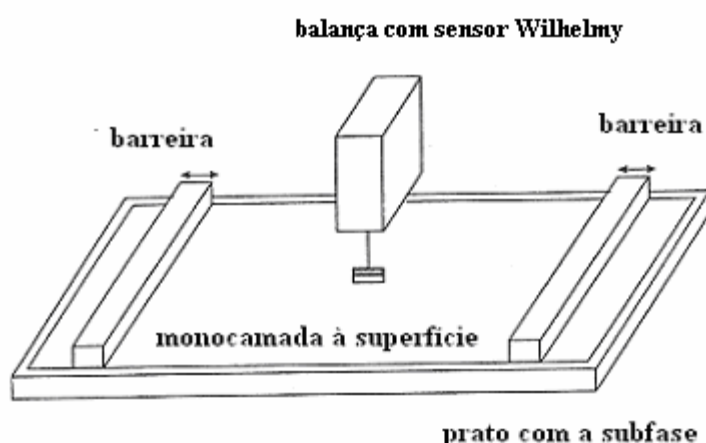


Figura 2.9 - Ilustração esquemática de uma balança de Langmuir-Blodgett (LB) com um sensor medindo a pressão de superfície, e barreiras reduzindo a área de superfície disponível.

2.6.3 Determinação do perfil proteico pelo método de Electroforese

A técnica de Electroforese é amplamente utilizada na análise de proteínas e ácidos nucleicos e é por isso uma técnica extremamente sensível e útil na análise da composição proteica da lágrima. As principais proteínas lacrimais como IgA, lactoferrina e lisozima podem ser separadas através desta técnica com elevada resolução. Para além destas proteínas referidas, outras 60 podem ser detectadas se posteriormente for realizada uma técnica electroforética bi-dimensional (Gachon *et al*, 1979).

2.6.4 Quantificação das proteínas lacrimais pelo método de ELISA

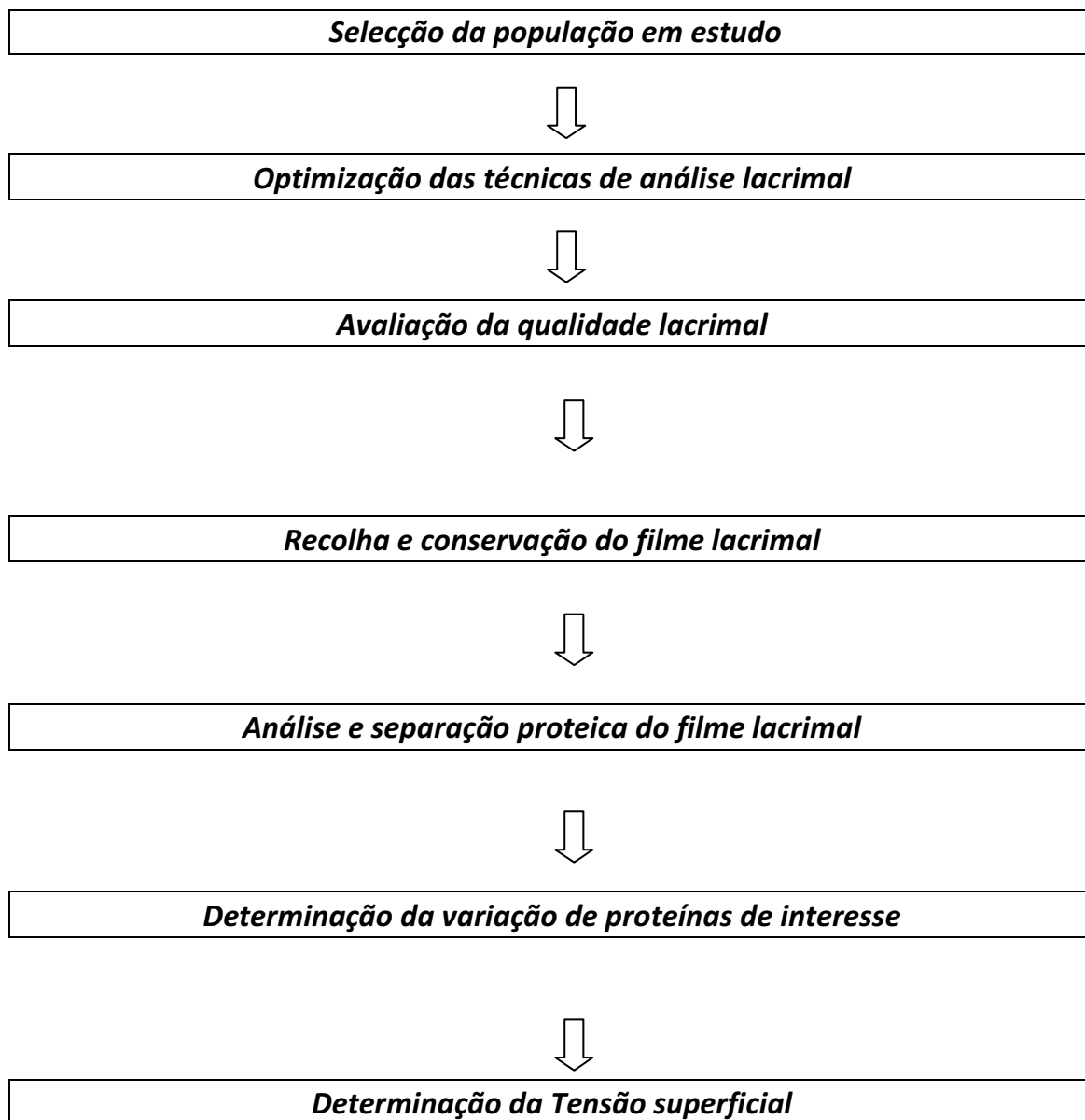
O teste de “ELISA” (do inglês “Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay”) é um teste imunoenzimático que permite a detecção de proteínas específicas em amostras biológicas, mesmo quando os volumes de trabalhos são extremamente reduzidos, como é o caso das amostras lacrimais. Tal é possível devido à elevada especificidade do método, já que tem por base a reacção antigénio-anticorpo. A sua especificidade e sensibilidade representam uma mais-valia relativamente aos métodos cromatográficos e de radioimunodifusão.

Capítulo 3. Desenvolvimento do projecto e Metodologia aplicada

Todos os exames foram realizados depois de uma explicação clara de todos os procedimentos de forma a obter um consentimento autorizado de cada indivíduo. Esta investigação segue os princípios da Declaração de Helsínquia (World Medical Association Declaration of Helsinki, Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 18th WMA General Assembly Helsinki, Finland, June 1964)

Neste capítulo, serão expostas a instrumentação e técnicas utilizadas na parte experimental do trabalho. Faz-se também uma caracterização da amostra escolhida, assim como uma breve descrição dos procedimentos estatísticos usados. A grande dificuldade do projecto prende-se com o facto das quantidades de lágrima recolhida ser adequada aos parâmetros a avaliar.

Estudar a composição bioquímica do filme lacrimal envolve a determinação de proteínas que se encontram em quantidades muito reduzidas, o que por si só exige o uso de métodos extremamente sensíveis. Como tal, numa fase inicial foi necessário otimizar a técnica a utilizar e testar algumas possíveis interferências nas diversas fases do projecto. A sequência dos procedimentos encontra-se esquematizada no diagrama seguinte.



3.1 Seleção da população em estudo

Foram seleccionados indivíduos não usuários de lentes de L.C., sem história clínica relevante, quer em termos de patologias oculares e sistémicas, quer em termos de medicação. A amostra final era constituída por 20 indivíduos, sendo 15 elementos do sexo feminino e 5 do sexo masculino, com uma idade média de $24 \pm 2,5$ anos.

3.2 Optimização das técnicas de análise lacrimal

1ª Fase – Determinação do período de avaliação e recolha lacrimal

- ✓ Determinar o período ideal de avaliação lacrimal adequado ao estudo em questão;

O período de avaliação escolhido deveria corresponder ao período em que um usuário de LC. As mantém na superfície ocular, uma vez que um dos objectivos deste trabalho era determinar se o desconforto que este por vezes sente ao fim do dia pode estar relacionado somente com o seu uso, ou se por sua vez factores de ordem fisiológica cíclica têm algum papel determinante. Por uma questão de se conseguir a presença dos indivíduos para realizar os exames e a recolha de lágrima, o horário escolhido foi entre as 9h e 10h e novamente no mesmo dia entre as 17h e as 18h. É importante referir que durante o período de avaliação da manhã todos os indivíduos estavam acordados há pelo menos uma hora. Foram realizadas 3 medidas para cada olho, e apresentado o valor médio.

2ª Fase – Adequação dos testes à quantidade lacrimal recolhida

- ✓ Determinar o método adequado de avaliação da qualidade lacrimal;

Como referido anteriormente, a qualidade lacrimal pode ser avaliada por diversas técnicas, recorrendo a diferentes instrumentos. Tendo em conta que a qualidade lacrimal não é o único parâmetro em estudo, este não deveria interferir nos restantes testes, pelo que não deveria ser invasiva. Como tal avaliou-se a qualidade lacrimal através do NIBUT usando o Tearscope.

- ✓ Escolher o método ideal de recolha da lágrima;

No que diz respeito à recolha do filme lacrimal existem vários estudos publicados em que a recolha é realizada usando o método de Shirmer, que consiste em colocar uma tira de papel absorvente no bordo temporal da pálpebra inferior (Choy *et al.*, 2001; Hoshino

et al., 2006; Kari *et al.*, 2008). Contudo, o método utilizado foi o de recolha por capilaridade usando para isso um microcapilar de vidro (figura 3.1), pois para além de não ser necessário um posterior tratamento da tira de papel, é menos invasivo se realizado cuidadosamente e como tal não provocará a existência de lágrima reflexa.



Figura 3.1 - Microcapilares utilizados na recolha lacrimal

- ✓ Determinar qual a quantidade média de lágrima passível de ser recolhida e analisada e mediante esses valores adequar os testes a utilizar;

Após realizados alguns ensaios, determinou-se que em média se pode recolher entre 10 a 15 μ l de lágrima a cada indivíduo, o que exige o uso de métodos muito sensíveis e optimizados na avaliação quer da concentração proteica, quer da tensão superficial.

3ª Fase – Optimização das técnicas de análise lacrimal e despiste de possíveis interferências

Uma vez que esta fase requeria inúmeros ensaios, foram usados neste estudo prévio 4 indivíduos de forma a optimizar a técnica para o perfil proteico em questão.

- ✓ O método de avaliação utilizado foi a Electroforese, como tal foi necessário determinar qual a quantidade mínima e máxima em μl ideal para realizar a electroforese em gel;

A optimização consistiu em primeiro lugar na determinação da quantidade de amostra a utilizar, para isso recolheu-se a amostra lacrimal de um dos indivíduos do grupo e realizou-se a separação electroforética de diferentes quantidades de amostra lacrimal (1 μl , 2 μl , 3 μl , 4 μl , 5 μl , 6 μl e 7 μl), de forma a determinar a quantidade mínima ideal a utilizar para a obtenção de uma boa coloração das bandas proteicas. Isto quer dizer que com quantidades inferiores, determinadas bandas não eram visíveis, enquanto com quantidades superiores à adequada as diferenças de concentração e perfil entre manhã e tarde não eram perceptíveis. Posteriormente optimizou-se a coloração do gel electroforético.

- ✓ Avaliar se existia diferença significativa entre olho direito e olho esquerdo;

As amostras lacrimais recolhidas foram analisadas por Electroforese em condições nativas. Como já foi referido anteriormente, as quantidades de lágrima recolhida eram bastante reduzidas e por isso foi necessário usar a lágrima recolhida de um olho para a avaliação dos parâmetros proteicos, enquanto que a do outro olho seria utilizada para avaliar a qualidade lacrimal e tensão superficial. Para validar a correlação desses resultados, foi necessário verificar que não existiam diferenças significativas entre os olhos de um mesmo indivíduo no período avaliado.

- ✓ Determinar se o perfil proteico e/ou NIBUT do final do dia era afectado pela recolha lacrimal matinal, ou seja se a secreção lacrimal após ter sido efectuada uma primeira recolha e/ ou avaliação iria condicionar o filme lacrimal secretado posteriormente, o que poderia falsear resultados;

Também se aferiu que a recolha de lágrima num determinado período em nada afectava a qualidade lacrimal e perfil proteico do período seguinte. Tal foi verificado alternando

a ordem temporal cíclica de recolha e avaliação lacrimal, ou seja se a recolha realizada às 9 horas da manhã influenciava o perfil proteico da lágrima recolhida às 17 horas. Realizaram-se então 2 tipos de ensaio:

Ensaio A

Amostras lacrimais recolhidas no mesmo dia; a primeira amostra recolhida às 9 horas e a segunda às 17 horas.

Ensaio B

De forma a eliminar qualquer influência do ensaio A, a recolha de novas amostras lacrimais dos mesmos indivíduos foi realizada uma semana depois. Para avaliar a influência da ordem cíclica da amostragem, desta vez a primeira amostra foi recolhida às 17 horas e a segunda recolha realizada às 9 horas do dia seguinte.

- ✓ Para a avaliação da tensão superficial optou-se pelo método de Langmuir-Blodgett. Foi necessário otimizar a técnica de Langmuir para determinar a tensão superficial da lágrima recolhida.

Também aqui foi necessário verificar se não existiam diferenças entre olho direito e esquerdo e se a ordem de avaliação não tinha qualquer importância pelas mesmas razões descritas anteriormente, uma vez que apenas possuíamos a lágrima do olho esquerdo para realizar a avaliação da tensão superficial.

3.3. Avaliação da qualidade lacrimal

Uma vez formada a película lacrimal, vários factores são responsáveis pela sua qualidade ou estabilidade. Como referido anteriormente, a qualidade lacrimal foi determinada pelo NIBUT recorrendo ao Tearscope Plus e respectivas grelhas (Keeler Instruments Ltd, Windsor). O Tearscope colocou-se tão perto do olho quanto possível, de forma a iluminar e observar a maior zona possível.

Durante a observação pede-se sempre ao indivíduo que mantenha ambos os olhos abertos e se ocorrer pestanejo antes de ruptura lacrimal esse tempo deve ser anotado.

É usual existir um reflexo de pestanejo a seguir a uma ruptura do filme no outro olho, ou na superfície conjuntival. Como os olhos permanecem abertos durante período de tempo prolongados (25s em média) é importante alternar entre olhos quando se realizam várias medidas (Guillon, 1998).

3.4. Recolha e conservação do filme lacrimal

Após a avaliação da qualidade lacrimal, foram recolhidos em média 10 μ l de lágrima, não reflexa, de cada olho dos indivíduos em estudo. A recolha foi efectuada com tubos microcapilares de vidro esterilizados como pode ser observado na figura 3.2, aos 20 pacientes no período da manhã e da tarde no mesmo dia, ao olho direito (OD) e esquerdo (OE). No total, foram recolhidas 80 amostras de aproximadamente 10 μ l.



Figura 3.2 - Recolha da lágrima por capilaridade

Ao longo da recolha os ependorfs contendo a lágrima foram devidamente identificados e mantidos no gelo (figura 3.3), e posteriormente sujeitos a um processo de congelamento por azoto líquido e armazenados a - 80°C.

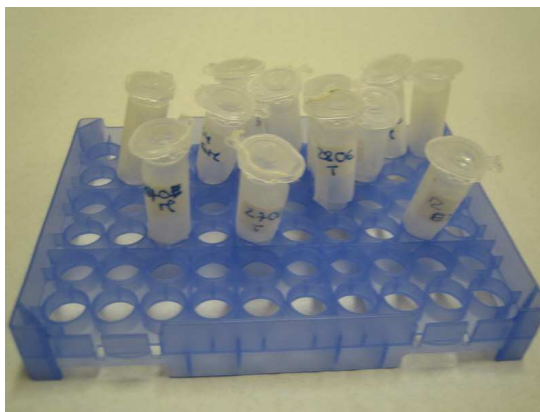


Figura 3.3 - Armazenamento das amostras lacrimais recolhidas em eppendorf's.

3.5. Análise e separação proteica do filme lacrimal por Electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

O princípio de funcionamento da electroforese baseia-se na migração das moléculas proteicas carregadas, ao longo de um campo eléctrico tendo como direcção um eléctrodo de carga oposta. No caso da PAGE as amostras contendo proteínas movem-se ao longo de uma matriz de gel de acrilamida imersa numa solução tampão de corrida, responsável pela manutenção da corrente eléctrica. A amostra é então separada nos seus componentes de acordo com o seu peso molecular, carga e conformação secundária. As moléculas mais pequenas conseguem mover-se mais rapidamente comparativamente às moléculas maiores, sendo essa velocidade de migração influenciada pela concentração de acrilamida do gel (Booz, 2001). O tamanho das proteínas pode variar desde alguns até varias centenas de Kilodaltons (KDa), facto que deve ser levado em consideração na escolha da concentração de gel.

Um dos objectivos da electroforese é a determinação do peso molecular das várias proteínas que compõem uma amostra, e tal como foi referido anteriormente, a sua migração deve-se tanto ao peso molecular, como à sua carga numa razão denominada densidade de carga. Como tal, torna-se necessário eliminar a carga como factor de migração, pois só desta forma saberemos com exactidão o seu peso molecular. Isso pode ser conseguido adicionando um detergente iónico, o dodecil sulfato de sódio

(SDS), ao gel de acrilamida e ao tampão de corrida. As diferentes proteínas ligam-se ao SDS e movem-se ao longo do gel como se tivessem cargas idênticas. Esta técnica em condições redutoras (desnaturantes) é então denominada SDS-PAGE. O padrão electroforético em condições nativas (não redutoras) é marcadamente distinto do padrão electroforético em condições redutoras.

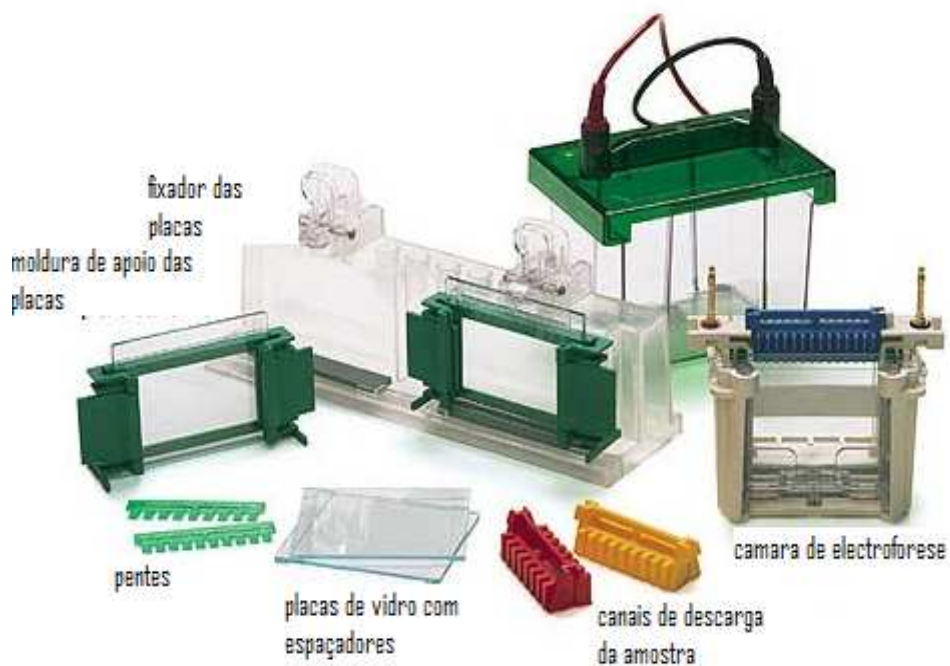


Figura 3.4 - Componentes do sistema Mini-PROTEAN 3. (Imagem retirada em www.bc.edu/.../biology/meta-elements/jp)

Neste trabalho, as amostras lacrimais recolhidas foram analisadas por electroforese em condições nativas e desnaturantes (SDS). Esta análise permitiu avaliar quais as proteínas lacrimais que sofreriam alterações na sua concentração ao longo do ciclo diário.

Determinou-se que a realização da electroforese nativa deveria ser efectuada com 3 μ l de lágrima e coloração efectuada com nitrato de prata. De forma a avaliar a existência de diferenças no que diz respeito aos perfis lacrimais do olho direito e esquerdo de um mesmo indivíduo e interferências na ordem temporal de recolha lacrimal.

Numa fase posterior, o perfil proteico da lágrima foi traçado através de uma electroforese realizada em condições desnaturantes utilizando 2 µl de lágrima, e o *marker broad range* (Prestained Protein Marker, Broad Range, BioLabs). A coloração foi efectuada com nitrato de prata. Esta fase serviu para determinar quais as alterações de perfil proteico ocorridas durante o ciclo fisiológico diário.

3.5.1 Electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições não desnaturantes

Independentemente de se tratar de uma electroforese em condições nativas ou desnaturantes, a preparação do gel onde as amostras vão ser separadas é o primeiro passo a realizar. A matriz de gel utilizado é obtida por polimerização entre a acrilamida (Bio-Rad) e bis-acrilamida (IBI-Kodak). Cada porção de gel é constituída por uma parte superior (*stacking gel*), importante na compactação das amostras aplicadas. A porção inferior (*resolving gel*), é responsável pela separação proteica da amostra. As duas porções diferem na concentração de acrilamida e consequente porosidade, e no pH (Puinhas, 2004). As soluções a utilizar na preparação do gel depende da porosidade necessária e está de acordo com as condições da electroforese.

3.5.1.1 Preparação do gel de poliacrilamida não desnaturante

De uma forma geral a matriz de gel é obtida pela polimerização de uma mistura de acrilamide (Bio-Rad) e bis-acrilamide (IBI-Kodak) catalisada pelo TEMED (N,N,N',N'- Tetrametilenodiamina) e o AP (persulfato de amónio). O TEMED em meio básico ou neutro interage com o AP produzindo radicais livres responsáveis pelo início da reacção de polimerização. O gel tem uma espessura de 1,5 mm e são preparadas utilizando o suporte Mini-Protean®.

Na tabela 3.1 encontram-se registadas todas as soluções necessárias à preparação do gel de electroforese.

Tabela 3.1 - Composição do gel de poliacrilamida (PAGE).

40 % Acrilamida (IBI-Kodak)	<i>Stacking gel (2, 5%)</i>	<i>Resolving gel (10%)</i>
	0,125 ml	1,25 ml
2 % bis-acrilammida (IBI-Kodak)	0,106 ml	0,65 ml
<u>Tampão resolving (2X)</u>	--	2,53 ml
Tris-HCl pH8.8 0,75 M		
Volume de H ₂ O 50 ml		
Massa (tris) 4,54275g		
<u>Tampão stacking (2X)</u>	1 ml	--
Tris-HCl pH6.8 0,25 M		
Volume de H ₂ O 50 ml		
Massa (tris) 1,51425g		
H ₂ O	0,669 ml	0,320 ml
AP	100 µl	250 µl
TEMED (Bio-Rad)	2 µl	3 µl
Volume Total	2 ml	5 ml

A composição que forma o *resolving* gel, é vertida em primeiro lugar no suporte até que atinja uma altura de aproximadamente 2,5 cm da extremidade superior. Adiciona-se então água enquanto esta polimeriza para minimizar o contacto com o ar (o O₂ inibe a reacção de polimerização). Assim que a polimerização termina, remove-se a água e verte-se sobre o gel anterior a composição de *stacking* gel. Neste momento insere-se o “pente” responsável pela formação dos poços, que é removido no final da polimerização.

3.5.1.2 Soluções necessárias à preparação do gel de poliacrilamida

Todas as soluções usadas para a preparação do gel foram preparadas antecipadamente, ajustando o pH das soluções tampão com HCl. As soluções preparadas foram posteriormente armazenadas a 4°C.

3.5.1.2 Preparação e separação das amostras na câmara electroforética

A matriz de gel é então montada no suporte e inserido na câmara de electroforese, que contém cerca de 200 ml de tampão de electroforese 1X.

✓ Composição do tampão de corrida electroforético (5X):

Tris base	10,7 g
Glicina	72 g
Volume de H ₂ O	1000 ml
Diluir de 100 ml para 500 ml	

Para a electroforese em condições nativas as amostras lacrimais foram previamente retiradas dos -80°C e aplicadas sem recurso a desnaturação, juntamente com o tampão de aplicação, numa razão de 3µl lágrima para 3µl de tampão de aplicação que contém na sua composição azul de bromofenol necessário à visualização da fonte de migração

durante o percurso electroforético e glicerol para que as amostras não dispersem dos poços.

✓ Composição do tampão de aplicação :

Tris-HCl pH 6.8/glicerol a 50%	0,32 M
Glicerol	5 ml
Volume de H ₂ O	10ml
M (tris)	0,388 g
Azul de Bromofenol a 0,01%	

As proteínas foram sujeitas a separação electroforética com base no seu tamanho num gel poliacrilamida 10%. As amostras movem-se paralelamente, devido à corrente eléctrica aplicada. A corrente eléctrica aplicada durante a electroforese foi de 10 mA, numa fase inicial (até que as amostras tivessem ultrapassado o *stacking gel*), aumentando para os 30 mA até que as amostras atingissem o final da matriz de gel. Esse tempo pode ser variável (± 1 hora). Para evitar o sobreaquecimento do gel o sistema foi mantido em gelo durante toda a corrida electroforética.

3.5.2 Electroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Esta técnica é em geral muito semelhante á PAGE, diferindo na composição dos seus constituintes basicamente pela adição de SDS e desnaturação das amostras

3.5.2.1 Preparação do gel de poliacrilamida SDS

Tal como no gel de acrilamida da PAGE, todas as matrizes de gel da SDS-PAGE são compostas por uma matriz de gel com espessura de 1,5 mm e são preparadas utilizando

o suporte Mini – Protean®. Na tabela 3.2 encontram-se registadas todas as soluções necessárias à preparação do gel de electroforese

Tabela 3.2 - Composição do gel de poliacrilamida (SDS- PAGE).

40 % Acrilamida (IBI-Kodak)	<i>Stacking gel (2, 5%)</i>	<i>Resolving gel (12%)</i>
	0,125 ml	1,5 ml
2 % bis-acrilamida (IBI-Kodak)	0,063 ml	0,75 ml
<u>Tampão resolving (4X)</u>		
Tris-HCl pH 8.9 1,5 M (0,4% SDS) Volume de H ₂ O 50 ml m (tris) 9,0855g m (SDS) 0,2 g	--	1,25 ml
<u>Tampão stacking (4X)</u>		
Tris-HCl pH 6.7 0,5 M (0,4% SDS) Volume de H ₂ O 50 ml m (tris) 3,0285 g m (SDS) 0,2 g	0,5 ml	--
H ₂ O	1,30 ml	1,5 ml
AP	20 µl	50 µl
TEMED (Bio-Rad)	2,5 µl	5 µl
Volume total	2 ml	5 ml

3.5.2.2 Soluções necessárias à preparação do gel de poliacrilamida

Estas soluções foram também preparadas antecipadamente, a sua principal diferença consiste na adição do detergente iónico SDS. O pH das soluções tampão necessárias à preparação do gel foi ajustado com HCl e as soluções armazenadas a 4°C

3.5.2.3 Preparação e separação das amostras na câmara electroforética

A matriz de gel foi montada no suporte e inserida na câmara de electroforese, que contém cerca de 200 ml de tampão de electroforese 1X.

As amostras lacrimais foram desnaturadas a 95°C durante 5 minutos, e aplicadas no gel juntamente com o tampão de aplicação numa razão de 2µl lágrima para 3µl de tampão de aplicação. As proteínas formam sujeitas a separação electroforética com base no seu tamanho num gel poliacrilamida 12%.

A corrente eléctrica levada a cabo na Mini-Protean® 3 cell da Bio-Rad foi de 10 mA, numa fase inicial, aumentando para os 30 mA durante 1 hora. Os resultados foram comparados com o marcador de pesos moleculares (Prestained Protein Marker, Broad Range, BioLabs).

✓ Composição do tampão de corrida electroforético (5X):

Tris base	25 mM
Glicina	193 mM
SDS	1 % (w/v)

✓ Composição do tampão de aplicação :

Tris-HCl pH 6.8/glicerol a 50%	0,32 M
Glicerol	5 ml
Volume de H ₂ O	4,8ml
M (tris)	0,388 g
SDS 1%	0,1 g
B –mercaptoetanol 2%	0,2 ml
Bromofenol a 0,01%	

3.5.3. Coloração proteica com nitrato de prata

Independentemente de terem sido separadas por electroforese nativa ou em condições desnaturantes, todas as bandas proteicas constituintes da lágrima foram coradas com nitrato de prata, uma técnica de coloração que devido à sua elevada sensibilidade se revelou ideal para as pequenas quantidades proteicas lacrimais.

Após remover gentilmente o gel do aparelho de electroforese este foi submetido a diversas etapas durante o processo de coloração:

1ª Etapa: Mergulhar o gel numa solução de metanol (50%) e ácido acético 5%, durante 20 minutos

✓ Solução de metanol (50%) e ácido acético 5%

25 ml de CH₃OH
 2,5 ml de CH₃COOH
 22,5 ml de H₂O

2ª Etapa: Após retirar o gel da solução anterior, colocou-se numa solução de metanol (50%) durante 10 minutos.

✓ Solução de metanol (50%)

25 ml de CH_3OH

25 ml de H_2O

3ª Etapa: Retirar o gel da solução anterior e proceder à sua lavagem com água, deixando-o posteriormente em água durante mais 10 minutos.

4ª Etapa: Depois da lavagem anterior o gel deve ser colocado durante 1 minuto numa solução de Tiossulfato de Sódio (0,02%).

✓ Solução de Tiossulfato de Sódio (0,02%)

50 ml de H_2O

0,01 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

5ª Etapa: Lavar duas vezes com água durante 1 minuto cada.

6ª Etapa: Deixar o gel numa solução de nitrato de prata (0,1%) à temperatura ambiente na ausência de iluminação, durante pelo menos 20 minutos.

✓ Solução de Nitrato de Prata (0,1%)

50 ml de H_2O

0,05 g de AgNO_3

7ª Etapa: Após remover o gel da solução anterior, este irá ser revelado com solução de carbonato de sódio (3%) e 20 µl de formaldeído. Inicialmente o gel deve ser lavado com parte da solução de carbonato de sódio e, posteriormente, mergulhado nesta em agitação constante e suave enquanto se adiciona o Formaldeído

✓ Solução de Carbonato de Sódio (3%)

50 ml de H ₂ O

1,5 g de NaCO ₃

8ª Etapa: Esta última etapa funciona como um ponto de paragem da revelação, que é alcançado adicionando ao gel uma solução de ácido acético (5%)

✓ Solução de ácido acético (5%)

47,5 ml de H ₂ O

2,5 ml de CH ₃ COOH

3.6. Quantificação de proteínas de interesse por Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

O teste de ELISA (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay) é um teste imunoenzimático que permite a detecção de proteínas específicas em amostras biológicas, mesmo que estas se encontrem em quantidades muito reduzidas.

O teste tem por base a reacção antigénio-anticorpo e sua posterior detecção através de reacções enzimáticas. A enzima normalmente utilizada neste teste é a peroxidase, que catalisa a reacção de dismutação do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em H₂O e O₂.

De uma maneira geral, este teste é efectuado num suporte sólido, uma placa de ELISA (figura 3.5), onde se encontra previamente aderido um anticorpo. Seguidamente é colocado sobre cada poço da placa a amostra biológica que contém a proteína que se pretende quantificar, neste caso o antígeno.

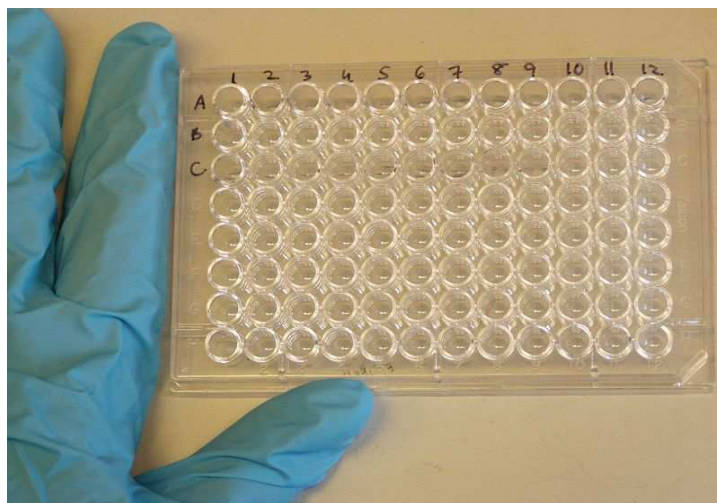


Figura 3.5 - Placa de ELISA com 96 poços.

Se existir antígeno ocorrerá a formação do complexo antígeno-anticorpo. Posteriormente será adicionado um segundo anticorpo, o anticorpo conjugado, e que se encontra ligado à peroxidase. Quando se adiciona o substrato específico da enzima conjugada, ocorre a reacção enzimática, o substrato muda de cor, apresentando os poços onde essa reacção ocorre uma coloração distinta (figura 3.6).



Figura 3.6. - Placa de ELISA com 96 poços. Após a reacção enzimática de detecção do antígeno.

A intensidade da cor desenvolvida pelo substrato é proporcional à quantidade de proteína que se pretende quantificar (específicos para o antígeno) presente na amostra biológica. A intensidade pode ser analisada por um espectrofotómetro, permitindo uma análise quantitativa (Abbas, 2002).

3.6.1. QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA A (IgA):

A IgA foi determinada através do Kit 8870 da ImunoDiagnostik. O teste tem como princípio de funcionamento a reacção entre o anticorpo de coelho anti IgA humana e a IgA presente na amostra lacrimal. Numa primeira fase, o período de incubação, as amostras e as soluções padrão contendo IgA ligam-se aos anticorpos policlonais que são imobilizados nos poços da microplaca. Para remover substâncias não ligadas é levado a cabo um processo de lavagem. Posteriormente, é realizado um segundo período de incubação, desta vez o anticorpo conjugado anti IgAs é adicionado e reconhece especificamente as IgA que se encontram ligadas ao anticorpo policlonal. Após novo processo de lavagem, a fase sólida é incubada com o substrato tetrametilbenzidina. A reacção é parada por meio de uma solução ácida e a cor azul é convertida em amarelo, a intensidade do amarelo lida no espectrofotómetro é directamente proporcional à quantidade de IgA.

3.6.2. Factor de Necrose Tumoral (TNF- α):

O TNF- α foi determinado através do Kit Human TNF- α /TNFSF1A da R&D Systems. Este método de quantificação é uma técnica imunoenzimática tipo *sandwich*. Um anticorpo monoclonal específico para o TNF- α é colocado em cada poço da microplata. Soluções padrão e amostras lacrimais são adicionados aos poços e o TNF- α liga-se ao anticorpo imobilizado. Após a lavagem qualquer substância não ligada é removida. Adiciona-se então o anticorpo conjugado com uma enzima específico para TNF- α e efectua-se novamente o processo de lavagem para remover qualquer reagente enzima-anticorpo não ligado. Por fim, adiciona-se o substrato para revelação da cor que terá intensidade proporcional à quantidade de TNF- α nas amostras

3.7. Determinação da Tensão Superficial pelo método de Langmuir-Blodgett

Esta técnica permite a avaliar a tensão superficial de amostras de volume reduzido, como é o caso do utilizado neste trabalho.

A balança de Langmuir-Blodgett (figura 3.7) é composta por :

- sistema de barreiras simétricas móveis que determine a área superficial;
- electrobalança para medir variações na força de tensão superficial;
- recipiente onde é colocada a subfase e na qual assentam as barreiras (“through”)
- “dipper” que permite deslocar verticalmente a uma velocidade controlada um substrato que, idealmente, será revestido pela monocamada existente na interface água/ar.

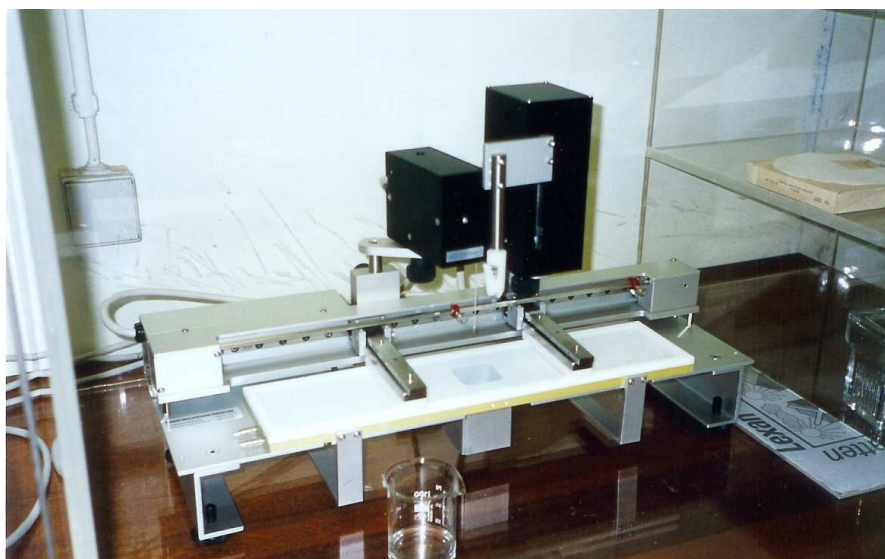


Figura 3.7 - Esquema da balança de Langmuir- Blodgett

Quando uma solução de uma substância anfifílica é colocada na superfície da água com uma micro-seringa, a solução espalha-se rapidamente para cobrir a área disponível. Forma-se uma monocamada na superfície da subfase como se pode ver na figura 3.8. Se a área superficial for reduzida por um sistema de barreiras, a concentração de moléculas anfifílicas à superfície aumenta, o que faz com que a tensão superficial diminua. A monocamada vai passando por diversas fases (gás, líquido e sólido).

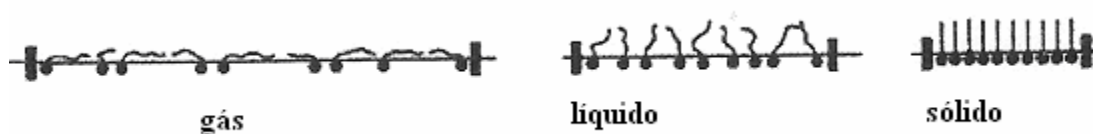


Figura 3.8 - Formação da monocamada (Carvalho, 2006).

Mede-se a pressão superficial: $\pi = \gamma - \gamma_0$ (diferença entre a tensão superficial sem monocamada e com monocamada). Com os dados recolhidos traça-se uma isotérmica da pressão superficial, Π , em função da área entre as barreiras (figura 3.9)

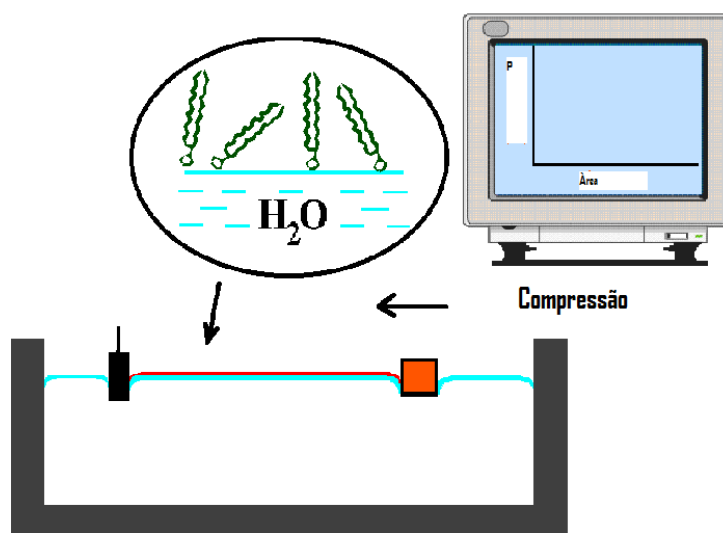


Figura 3.9 - Construção das isotérmicas de Langmuir (Adaptado de Carvalho, 2006)

Para determinar a tensão superficial das amostras lacrimais, retiraram-se previamente do frio de forma que ficassem à temperatura ambiente.

Colocou-se aproximadamente 250 ml de água desionizada, grau Mili – Q na balança e esperou-se que a temperatura da água estabilizasse para que se pudessem traçar as isotérmicas. Quando estabilizado, marcou-se o “zero na balança”. De seguida, injectaram-se 10 μ l da amostra lacrimal na superfície da água com a ajuda de um micro-seringa e esperou-se 15 minutos até que estes se espalhassem (figura 3.10).

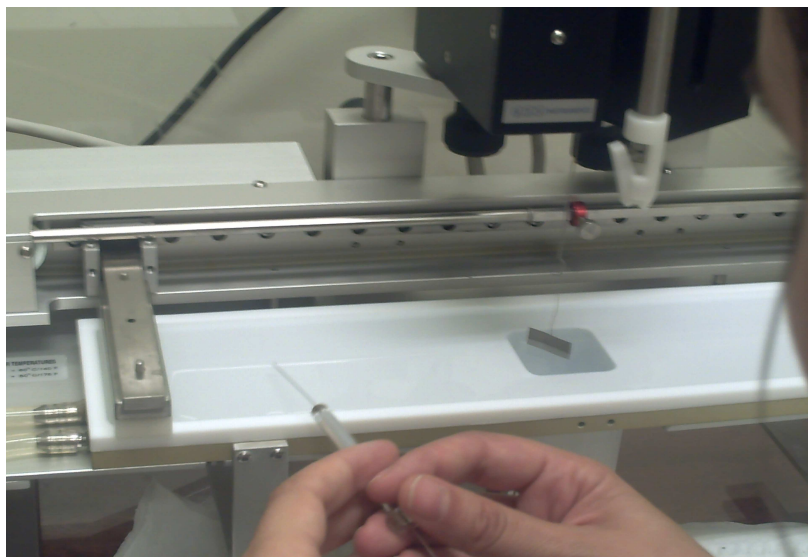
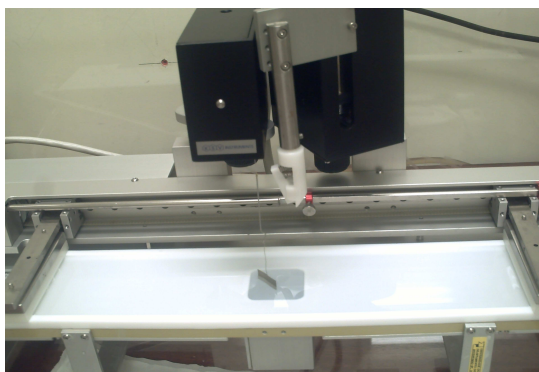
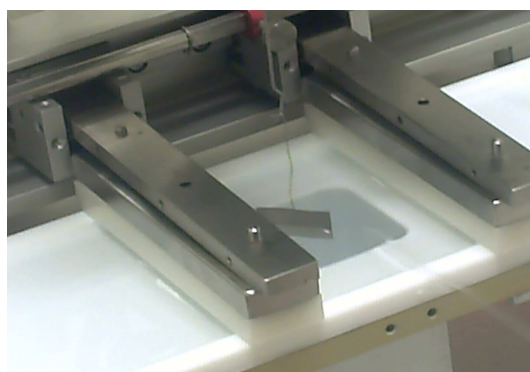


Figura 3.10 - Colocação da lágrima com auxílio da micro-seringa.

Através do software deu-se início ao ciclo de compressão / expansão das barreiras, iniciando-se o traçado da isotérmica. Na figura 3.11, pode-se observar as barreiras no estado de expansão (figura 3.11 A) e compressão máxima (figura 3.11B)



A



B

Figura 3.11 - Barreiras no estado de expansão (A) e de compressão (B).

3.8 Análise Estatística

Na análise dos resultados que se apresentam de seguida nesta tese, foi utilizado o programa estatístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versão 17.0. Para todas as hipóteses, $p \leq 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa.

Capítulo 4. Apresentação e discussão dos resultados

O potencial impacto do uso de LC na película lacrimal está bem documentado, mas pouca investigação parece ter sido realizada relativamente à alteração que pode ocorrer nos parâmetros lacrimais ao longo do dia-a-dia do paciente comum não usuário de LC

Neste capítulo apresentam-se e discutem-se os resultados experimentais obtidos nos exames realizados à película lacrimal, nos dois momentos de recolha lacrimal. Neste estudo pretende-se obter informação clínica, acerca da qualidade lacrimal em termos de NIBUT, se esta é mantida ao longo de todo o dia ou se por sua vez sofre alterações. Pretende-mos também verificar se existe alguma relação entre o NIBUT e a tensão superficial da lágrima. Já no que diz respeito à composição bioquímica pretendemos saber se as proteínas que compõem o filme lacrimal são mantidas em termos de concentração ao longo do dia, ou se pelo contrário sofrem algum padrão de variação.

4.1 Avaliação da qualidade lacrimal

Os resultados obtidos durante a avaliação do NIBUT para o olho direito (OD) e olho esquerdo (OE), nos dois períodos diários em estudo encontram-se na tabela 4.1. No caso em que os indivíduos pestanejaram não foram consideradas essas avaliações de NIBUT para o estudo da qualidade lacrimal, por não poderem ser considerados válidos.

Foram sempre realizadas 3 medidas para cada olho e na tabela está apresentada a sua média e desvio padrão. Determinou-se o valor médio de NIBUT no período da manhã e da tarde, tanto para o OD, como para o OE e apresentando-se também os valores mínimos e máximos observados.

Tabela 4.1 – Valores médios, mínimos e máximos de NIBUT para o período matinal e da tarde.

	n	Mínimo	Máximo	Media \pm SD	p
NIBUT manhã (s)	20	10.70	23.80	17 \pm 3.22	0.000
NIBUT tarde (s)	20	4.30	19.30	12.79 \pm 4.26	

Verificou-se que não existe diferença significativa entre o OD e o OE do mesmo indivíduo, contudo da análise da tabela 4.1 onde estão apresentados os valores médios deste teste, observa-se que o valor de NIBUT no período da manhã é superior ao valor de NIBUT do período da tarde, sendo essas diferenças estatisticamente significativas

Este decréscimo do NIBUT contraria o estudo realizado por Bitton *et al.* (2008), que comparou a variação do filme lacrimal, antes e após o período nocturno, usando 2 grupos de indivíduos distintos: o grupo com sintomas de olho seco (DE) e o grupo assintomático (NE). Avaliou o NIBUT através do topógrafo corneal (Atlas, Carl Zeiss Canada, Toronto, IN) em 3 períodos do dia, 7h, 10h e 22h. Detectou que efectivamente no grupo DE existia um decréscimo do NIBUT no período nocturno, mas tal não se verificava no grupo NE. Já no que diz respeito aos valores médios de NIBUT estes são ligeiramente inferiores aos encontrados no nosso estudo e são de $12,88 \pm 7,23$ s e $7,79 \pm 7,84$ s para os grupos NE e DE respectivamente, o que poderá ser resultado do uso do topógrafo em vez do Tearscope.

Não foi âmbito deste estudo verificar a existência de diferença de NIBUT associada ao género como foi proposto por Snyder e Fullard (1991). Este estudo (Snyder e Fullard, 1991), ao realizar a medida do NIBUT com o Xeroscope, obteve valores de NIBUT superiores para o género masculino, $59,3 \pm 2,1$ s, comparativamente ao género feminino $46,3 \pm 16,6$ s.

No estudo efectuado por Mohidin *et al.* (2002) que após avaliar uma população constituída por 48 indivíduos da Malásia com idades compreendidas entre os 7 e 60 anos, verificou que os valores médios de NIBUT medidos com o Tearscope eram de $15,8 \pm 9,4$ numa gama que oscilou entre os 6 e 20 segundos, sem qualquer padrão associado ao género. Neste estudo, verificou-se contudo que o NIBUT diminuía com a idade. Este parâmetro não foi abordado no presente trabalho, já que a amostra em estudo se inseria num grupo etário mais restrito.

É de referir ainda que os valores médios de NIBUT avaliados se encontram abaixo dos 20 segundos esperados e sugeridos pela bibliografia (Jane *et al.*, 2002) como sendo os valores normais para pacientes sem sintomas de olho seco. Outros estudos realizados nesta mesma Universidade apontam valores semelhantes de NIBUT e até inferiores (dados ainda não publicados), não se encontrando razão que o justifique.

4.2. Análise e separação proteica do filme lacrimal

4.2.1 Electroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (PAGE)

Uma vez que o objectivo principal deste método era averiguar se existiam diferenças no perfil lacrimal do OD relativamente ao OE e determinar também se a primeira recolha lacrimal influenciaria o segundo momento de recolha, os resultados obtidos para os 4 indivíduos iniciais, serviram como linha de orientação para a metodologia a adoptar, bem como possíveis alterações lacrimais a pesquisar.

- ✓ Verificou-se que não existia diferença entre o ensaio A e B, ou seja, os resultados obtidos eram coincidentes com a hora de recolha independentemente da ordem pela qual é feita.
- ✓ Também se verificou que não existiam diferenças, de perfil proteico, entre o olho direito e esquerdo de um mesmo indivíduo.

Por observação do gel de electroforese de poliacrilamida a 10% (figura 4.1) é também possível verificar que existem diferenças entre as amostras lacrimais, da manhã e da tarde, no que diz respeito à intensidade das bandas proteicas do mesmo indivíduo e mesmo o aparecimento de outras bandas no perfil (figura. 4.1, P3). Contudo, não se pode definir com exactidão as proteínas envolvidas já que o factor carga está implicado na migração das proteínas o que não nos permite determinar o peso molecular das proteínas detectadas.

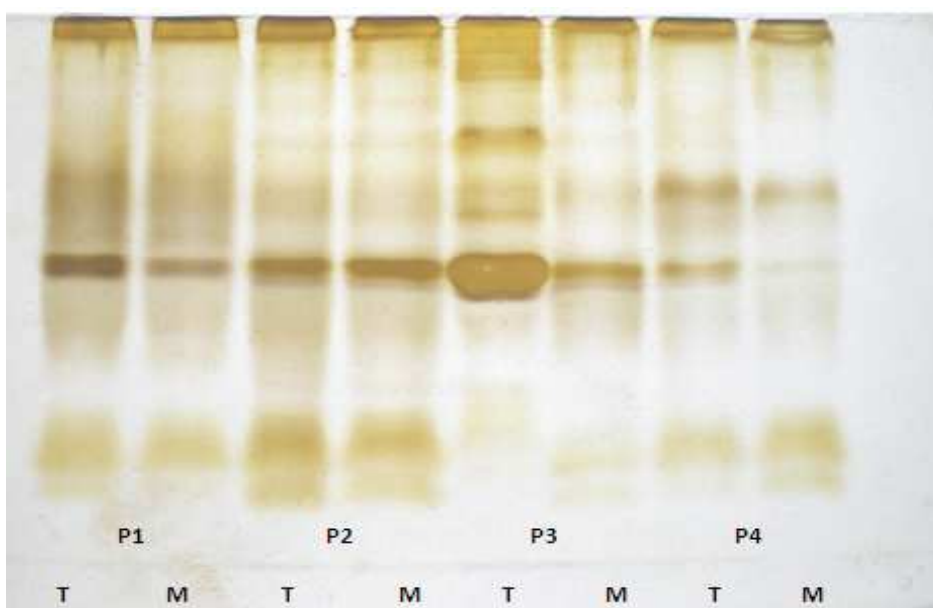


Figura 4.1 - Bandas proteicas separadas em gel de poliacrilamida 10% em condições nativas. P1, P2, P3 e P4 representam os 4 indivíduos envolvidos no estudo, M a amostra lágrima matinal e T a amostra lacrimal da tarde

4.2.2 Electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Também nesta fase do estudo foram usados 4 dos 20 indivíduos do grupo de estudo, uma vez que o propósito continuava a ser averiguar se existiam ou não alterações lacrimais nos período diários em estudo. Neste caso, devido à existência de um marcador proteico de massa molecular (figura 4.2) e da eliminação do factor carga das proteínas em questão, foi possível identificar quais as proteínas que sofrem alterações diárias.

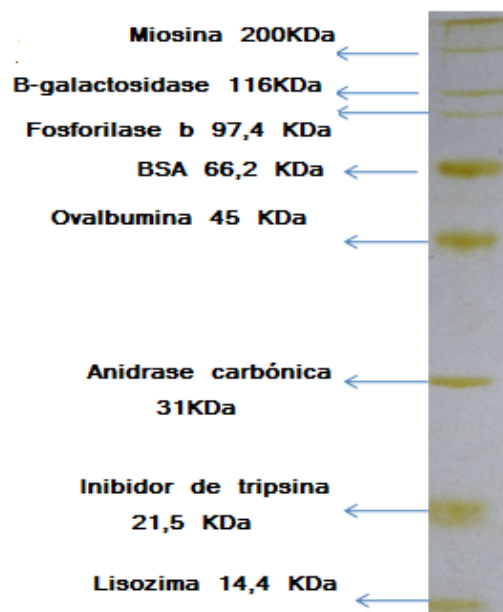


Figura 4.2- Proteínas constituintes do marcador de pesos moleculares.

Por observação do gel de electroforese de poliacrilamida SDS a 12% (figura 4.3) é possível verificar que existem diferenças entre as amostras lacrimais, da manhã e da tarde, principalmente no que diz respeito à intensidade das bandas proteicas do mesmo indivíduo.

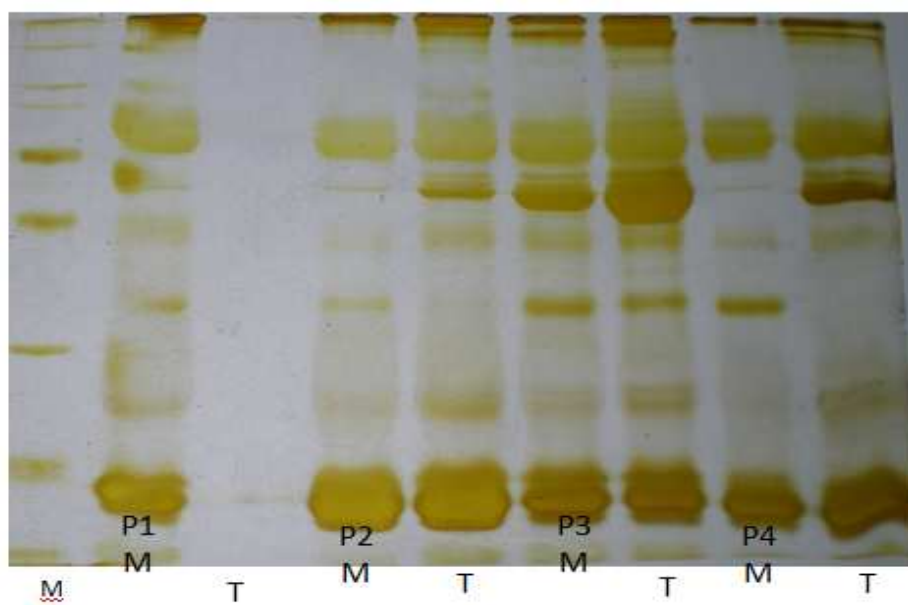


Figura 4.3 - Bandas proteicas separadas em gel de poliacrilamida-SDS 12%. . P1, P2, P3 e P4 representam os 4 indivíduos envolvidos no estudo, M a amostra lágrima matinal e T a amostra lacrimal da tarde. A primeira amostra da esquerda é referente ao marcador de pesos moleculares.

Uma vez que o peso molecular das proteínas que constituem o marcador são conhecidas é possível estabelecer uma relação linear entre a distância de migração e o peso molecular correspondente. Esta relação linear permite inferir sobre a identidade de algumas proteínas presentes na amostra lacrimal. Essa relação (figura 4.4) foi usada para calcular o peso molecular aproximado de cada banda proteica da amostra lacrimal e a proteína que constitui a banda.

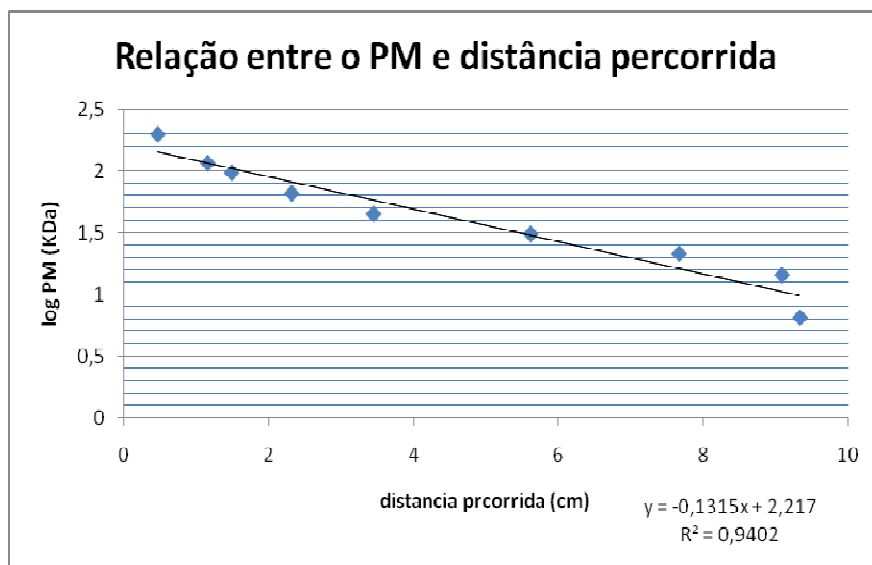


Figura 4.4 - Gráfico que relaciona a distância percorrida no gel e peso molecular (PM) da proteína correspondente.

Recorrendo à relação linear entre a distância percorrida e o peso molecular dada pelo marcador de pesos moleculares, e comparando com os pesos moleculares de proteínas conhecidos pela literatura, determinaram-se algumas proteínas.

Após analisar as diferenças lacrimais ao longo do dia obtidas por SDS-PAGE (figura 4.5) verifica-se que o perfil proteico da amostra lacrimal recolhido entre as 9h e as 10h horas difere em determinadas bandas do perfil proteico da amostra lacrimal recolhida entre as 17h e as 18h:

- A lactoferrina não sofre alterações visivelmente significativas de concentração ao longo do dia.

- A albumina, as cadeias pesadas e leves de Ig's parecem ser as proteínas que sofrem grandes variações, tendo uma maior concentração ao fim do dia.
- A banda 36 KDa tem uma maior concentração no início da manhã.
- A lipocalina, prolactina, lisozima e cistatina também não parecem sofrer alterações consideráveis ao longo do dia.

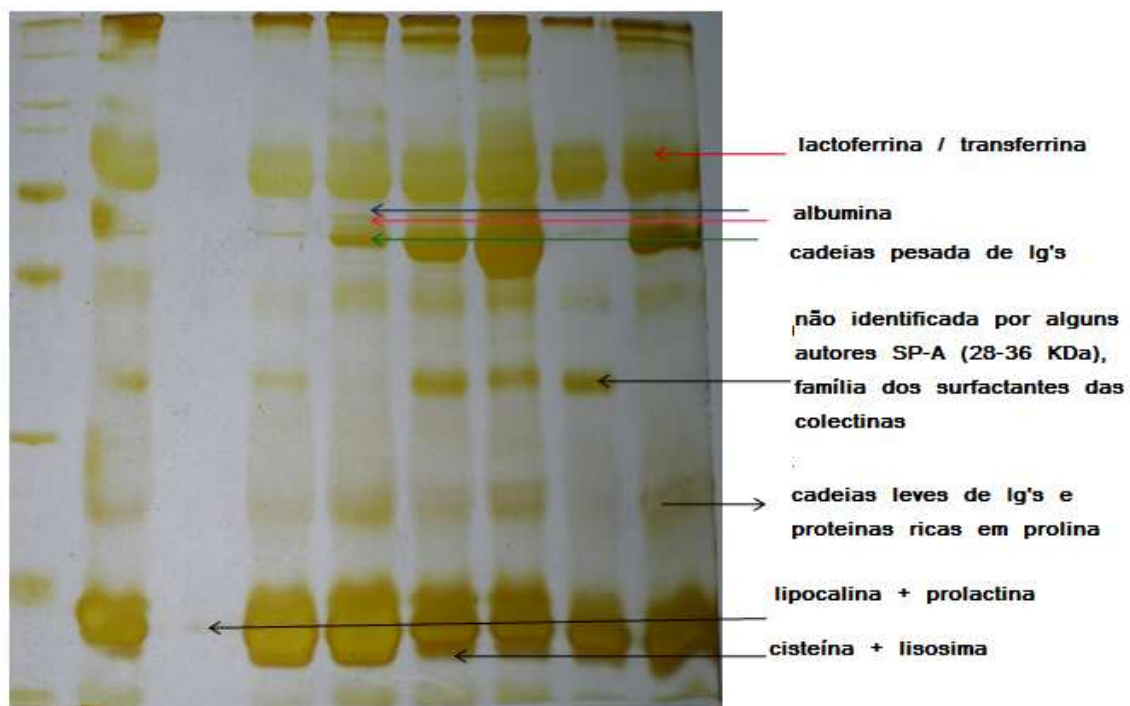


Figura 4.5 - Determinação das proteínas correspondentes a cada banda.

Esta variação na concentração de diversas proteínas lacrimais na ausência de LC é suportada num estudo publicado por Cho *et al.* (2000). No seu estudo, embora não tenham abordado um padrão diário, faz referência à não existência de manutenção das concentrações de determinadas proteínas. Estes investigadores monitorizaram os níveis de proteínas ao longo de 3 dias, quantificando as proteínas totais pelo método de Bradford e separando-as por SDS-PAGE. Os resultados mostraram que as variações nas proteínas totais não eram significativas de dia para dia. Contudo, ao avaliar especificamente determinadas proteínas detectou que algumas sofriam alterações

significativas, enquanto outras sofriam alterações mais moderadas, A albumina sérica sofria variações diárias superiores a 61 %, o que está de acordo com o nosso padrão de SDS-PAGE. Já as variações de lactoferrina, pré-albumina específica da lágrima e lisozima sofriam variações mais pequenas, o que vai de encontro às pequenas diferenças obtidas nos nossos resultados.

4.3. Determinação da variação de proteínas de interesse por ELISA

Após a electroforese SDS-PAGE decidiu-se quantificar por ELISA a IgA de forma a identificar alterações nas cadeias pesadas de Ig's, pois a IgA é a principal imunoglobulina secretada no filme lacrimal e de elevada importância na defesa da superfície ocular.

Apesar de não ter sido obtida qualquer informação acerca do TNF- α através dos perfis electroforéticos obtidos, também se decidiu quantificar esta citocina devido ao seu papel pró-inflamatório, ou seja, é de esperar que esteja aumentada em situações de inflamação e dano de tecido corneal, mas será que não tem também ela um padrão diário?

4.3.1 Imunoglobulina A

Nesta determinação apesar de terem sido usadas as amostras lacrimais dos 20 indivíduos, foram validados somente 11, devido a factores laboratoriais.

No kit usado para determinação da concentração da IgA lacrimal foram fornecidas amostras com concentrações de IgA, previamente determinadas. Através da sua densidade óptica (tabela 4.2), foi possível construir uma curva de calibração (figura 4.6) que relaciona a densidade óptica das várias amostras e a sua concentração.

Tabela 4.2- valores da densidade óptica a 450 nm para as amostras de calibração.

[IgA] ng/ml	Densidade óptica
0	0.0872
22.2	0.1529
66.6	0.2321
200	0.454
600	0.8836

O gráfico seguinte representa a curva de calibração utilizada para determinar as concentrações de IgA lacrimais através da densidade óptica medida.

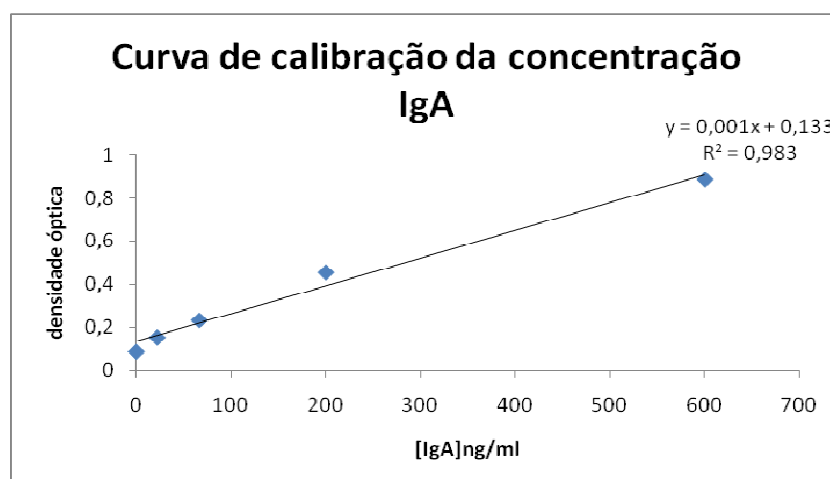


Figura 4.6 - Gráfico da calibração dos valores de densidade óptica e [IgA] correspondente.

O estudo das amostras lacrimais foi realizado em duplicado, sendo os valores da densidade óptica dos dois ensaios apresentados na tabela 4.3. Determinou-se a densidade óptica média de cada amostra.

Posteriormente, através da curva de calibração traçada anteriormente (figura 4.6) calcularam-se as concentrações de IgA presentes em cada uma das amostras dos 11 indivíduos.

Tabela 4.3 – Valores de densidade óptica e concentração correspondente para IgA

Nº amostra	Densidade óptica 1ºensaio manha	Densidade óptica 2ºensaio manha	[IgA]mg/ml Amostra manha	Densidade óptica 1º ensaio tarde	Densidade óptica 2ºensaio tarde	[IgA]mg/ml Amostra tarde
1	1,7656	1,5702	2,36	1,3482	1,4542	1,95
2	0,9101	0,9362	1,21	1,3701	1,1637	1,74
3	2,0026	2,0483	3,32	1,8717	1,8461	2,64
4	2,0068	2,1595	2,99	1,8265	1,8803	2,65
5	1,9166	1,8924	2,73	0,794	0,6317	0,89
6	1,5982	1,5399	2,21	0,5962	0,5757	0,69
7	1,7797	1,7416	2,50	1,1706	1,323	1,71
8	1,9328	2,1344	2,92	1,8699	2,1029	2,85
9	2,3641	2,409	3,47	2,0257	2,0331	2,91
10	2,1985	2,0575	3,07	1,9121	2,0634	2,85
11	1,8458	1,5859	2,44	1,8072	1,5811	2,40

As concentrações de IgA foram então sujeitas a um tratamento estatístico em SPSS, com ilustrado na tabela 4.4.

Tabela 4.4 – valores de densidade óptica e concentração correspondente para IgA tratados estatisticamente no SPSS

	n	Mínimo	Máximo	Media ± SD	p
IgA manha (mg/ml)	11	1.21	3.47	2.656 ± 0.625	0.024
IgA tarde (mg/ml)	11	0.69	2.91	2.116 ± 0.789	

Observa-se que existe um padrão de variação diária de IgA, sendo que a sua concentração lacrimal é geralmente superior no período matinal. As diferenças entre os valores da manhã e da tarde são estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Para uma melhor visualização, construiu-se um gráfico (figura 4.7) com as concentrações de IgA individuais, determinadas em cada uma das amostras da manhã e da tarde para permitir uma melhor comparação entre os dois períodos diários.

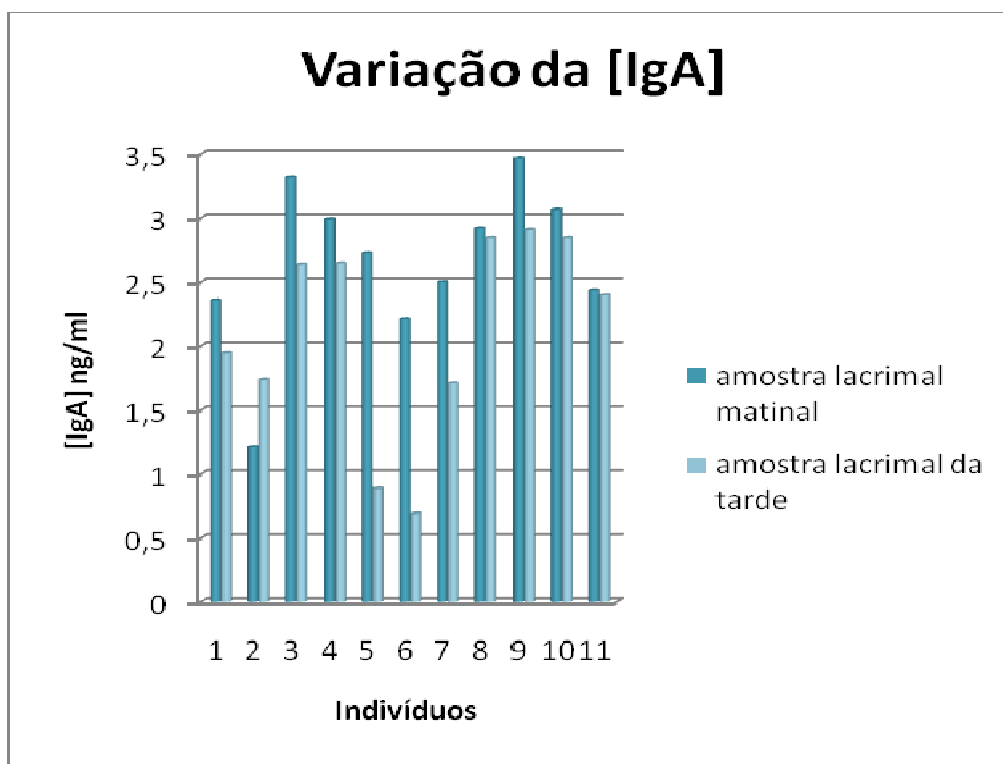


Figura 4.7 – comparação entre as [IgA] do período da manhã e período da tarde.

Esta maior concentração no período matinal também observada no padrão de electroforese, pode dever-se a diversos factores, entre eles uma menor quantidade lacrimal produzida na manhã, o que por si só faz aumentar a concentração das proteínas na lágrima. Contudo, este factor só faria aumentar também outras proteínas lacrimais e não exclusivamente a IgA. Outra explicação pode ser devida a um estado clínico inflamatório provocado pelo encerramento ocular durante o período nocturno, no entanto, tal será improvável uma vez que no momento da recolha já todos os indivíduos estavam acordados há pelo menos 1 hora. O mais provável será que esta proteína, produzida pelos plasmócitos, se tenha acumulado durante o período nocturno e que à medida que o tempo passe estabilize.

Contrariamente ao objectivo do trabalho de Sen *et al.* (1978), o presente estudo não se prendeu com a existência de diferença na concentração de IgA associada ao género. Este autor avaliou a concentração de várias imunoglobulinas em amostras lacrimais por imunodifusão numa população de 220 adultos saudáveis numa faixa etária entre os 2 até

aos 86 anos e verificou que a concentração média de IgA era de 30,7 mg/ 100ml. Os valores encontrados neste estudo são muito inferiores aos encontrados no nosso estudo, o que pode ser explicado pela sensibilidade da técnica. Como referido anteriormente a concentração de IgA era superior na classe feminina. Verificou ainda que a concentração de IgA aumentava linearmente com a idade o que não foi possível verificar no nosso estudo, já que a faixa etária foi restrita.

No que diz respeito à manutenção da concentração de IgA no ciclo diário existiam já alguns estudos prévios, descritos de seguida, que suportam a ideia desta sofrer flutuações ao longo do dia, como se pode verificar pelos nossos resultados.

Robert *et al.* (1992) verificou que os níveis de IgA aumentavam durante o período de sono devido ao prolongado fecho ocular o que evidenciava um estado inflamatório nocturno. Nesse estudo, foram recolhidas amostras lacrimais antes do fecho ocular prolongado e imediatamente após a sua abertura, posterior ao período de sono e quantificaram-se imunologicamente as principais proteínas, nomeadamente a IgA, que aumentou significativamente de cerca de 0,23 mg/ml antes do período nocturno para 8,40 mg/ml. Também a albumina sérica aumentou de 0,02 até 1,10 mg/ml. Em contraste, a lisozima, a lactoferrina e a pré albumina permaneceram praticamente inalteradas.

Também para Tan *et al.* (1993) existem variações da concentração de IgA durante o sono. Segundo este autor, o período de sono induz uma alteração no tipo de filme lacrimal produzido de reflexo para basal. Esta alteração é acompanhada pela indução de um estado subclínico inflamatório, que se torna evidente pelo aumento dos níveis de albumina, conversão da molécula do complemento C3 para C3c e recrutamento de células polimorfonucleares. De forma a determinar a sequência destes processos interdependentes, o autor recolheu amostras lacrimais de não usuários de LC após 1, 2, 3 e 5 horas de sono, e verificou que os níveis de albumina e IgA aumentavam durante as 3 primeiras horas e que ao mesmo tempo ocorria a activação do complemento, factores estes que ditavam o recrutamento celular que ocorria entre as 3h e as 5h após o encerramento ocular

Estes estudos apesar de terem metodologia e objectivos diferentes, não tendo por intenção abordar a questão da variação de IgA no período diário de uso de LC, podem trazer algum paralelismo para o nosso estudo. Poderá ser possível que as variações de IgA que ocorrem nos usuários de LC, ocorram também nos não usuários, fazendo parte de um ciclo normal diário de variação, uma vez que os sintomas de desconforto ocular ao final do dia por usuários de LC é muitas vezes experimentado por não usuários. Esta ideia é suportada por um estudo de Hoshino *et al.* (2006) que comparou os níveis de IgA de quatro grupos diferentes. O autor não encontrou diferenças significativas entre o grupo não usuário saudável e o grupo de usuários com $1249,0 \pm 1025,0 \mu\text{g/ml}$ e $1057,4 \pm 1583,3 \mu\text{g/ml}$ respectivamente. Contudo, verificou que existiam diferenças significativas destes para o grupo com síndrome de olho seco ($197,8 \pm 91,3 \mu\text{g/ml}$) e com herpes ocular ($759,7 \pm 467,8 \mu\text{g/ml}$). No grupo saudável não usuário de LC monitorizou-se a IgA em 3 períodos do dia, início da manhã, tarde e noite no mesmo dia e verificou-se que os níveis de IgA mais elevados eram encontrados à tarde, facto que não é suportado pelo nosso estudo.

Outros estudos de variação de IgA entre usuários de LC foram realizados por Glasson *et al.* (2006) e Stapleton *et al.* (1998) e ambos chegaram à conclusão que não existiam variações de IgA associadas exclusivamente ao uso de LC. Stapleton *et al.* (1998) tendo como ponto de partida o facto de existir um aumento de IgAs durante o período nocturno, como forma de mecanismo de defesa fisiológica do próprio olho, quis verificar se essa resposta era alterada com a introdução de LC. Recolheu amostras lacrimais antes e após 8 horas de sono em dois grupos distintos, um grupo controle, que dormiu sem lentes e outro grupo que dormiu com lentes. De facto, a introdução de LC durante o período de sono não trouxe nenhuma alteração em termos de composição lacrimal proteica entre os grupos. As únicas variações de IgA que se verificaram foram as que ocorrem fisiologicamente durante o período nocturno, ou seja o aumento de IgA foi proporcionalmente o mesmo nos 2 grupos. Mais recentemente, Glasson *et al.* (2006) avaliou as propriedades do filme lacrimal de um grupo não usuário de LC e, posteriormente, submeteu esse mesmo grupo ao uso de LC durante 6 horas. Verificou que não existia alteração sob o ponto de vista da composição proteica, nomeadamente IgA e que a única alteração se prendia com a diminuição do NIBUT. Pode então

pensar-se que o desconforto que usuários de LC evidenciam ao fim do dia de uso pode ser devido a um decréscimo dos níveis de IgA, que os torna mais susceptíveis a infecções oculares, mas que esse decréscimo é fisiológico e faz parte do seu ciclo diário normal.

4.3.2 Determinação do Factor de Necrose Tumoral (TNF- α)

No kit usado para determinação da concentração da TNF- α lacrimal foram fornecidas amostras com concentrações de TNF- α , previamente determinadas para a construção da curva de calibração que relaciona a densidade óptica com a concentração. (tabela 4.5 e figura 4.8).

Tabela 4.5- valores da densidade óptica a 450 nm para as amostras de calibração

[TNF] pg/ml	Densidade óptica
0	0.0575
1.9	0.1013
3.9	0.1529
7.81	0.2248
15.6	0.3544
31.25	0.6564
62.5	1.0608
125	1.76

A figura 4.8 representa a curva de calibração utilizada para determinar as concentrações de TNF- α lacrimais por ELISA.

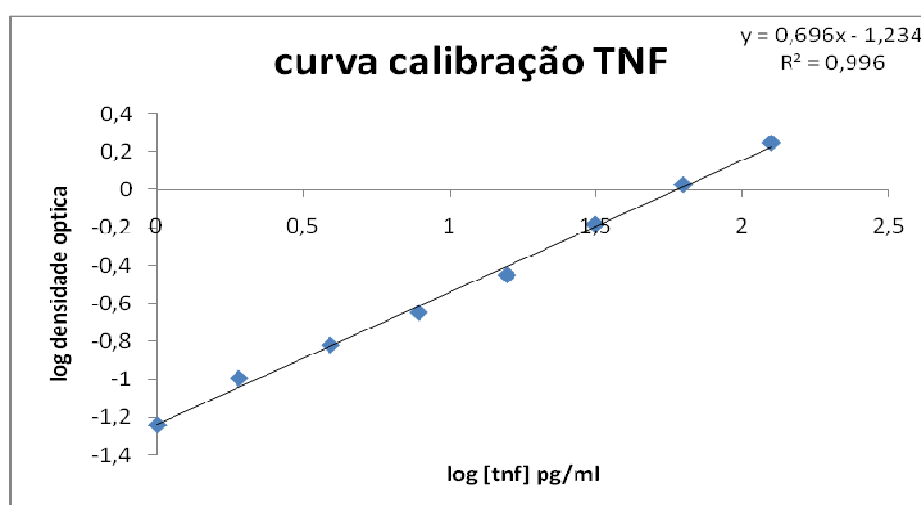


Figura 4.8 – Curva de calibração dos valores de densidade óptica e [TNF] correspondente.

Os valores da densidade óptica média de cada amostra estão representados na tabela 4.6. Posteriormente, através da curva de calibração traçada (figura 4.8) calcularam-se as concentrações de TNF- α presentes em cada uma das amostras dos 20 indivíduos apresentadas na tabela 4.7

Tabela 4.6 – Valores de densidade óptica e concentração correspondente para TNF- α

Nº amostra	Densidade óptica do ensaio da manhã	[TNF- α] pg/ml	Densidade óptica do ensaio da tarde	[TNF- α]pg/ml
1	0,6325	306,7679	0,1224	29,0411
2	0,1028	22,606	0,0544	9,0680
3	0,1433	36,415	0,0509	8,2424
4	0,2009	59,142	0,055	9,2119
5	0,0922	19,337	0,0562	9,5017
6	0,0806	15,943	0,0634	11,297
7	0,0577	9,8679	0,0663	12,046
8	0,0722	13,614	0,0504	8,1265
9	0,0549	9,1878	0,0588	10,139
10	0,0547	9,7943	0,0701	13,049
11	0,0518	8,4525	0,0596	10,337
12	0,0563	9,5260	0,0583	10,015
13	0,053	8,7349	0,0942	19,942
14	0,0544	9,0680	0,0594	10,288
15	0,0601	10,612	0,0556	9,3565
16	0,1111	25,272	0,0676	12,386
17	0,0513	8,3356	0,0613	10,763
18	0,0539	8,9486	0,0631	11,220
19	0,0583	10,015	0,0618	10,889
20	0,0943	19,973	0,0626	11,093

Tabela 4.7 – Valores de densidade óptica e concentração correspondente para o TNF- α tratados estatisticamente no SPSS

	n	Mínimo	Máximo	Media \pm SD	p
TNF manhã (pg/ml)	20	8.336	59.142	10.006 \pm 12.57	0.056
TNF tarde (pg/ml)	20	8.127	19.942	10.816 \pm 2.511	

A concentração de TNF- α dos vários indivíduos encontra-se dentro de uma gama de concentrações bastante ampla ao longo do dia, tendo variado entre 306,77 – 8,1265 pg/ml. No entanto, as diferenças entre os valores da manhã e da tarde não são estatisticamente significativas.

Construiu-se um gráfico (figura 4.9) com as concentrações de TNF- α determinadas em cada uma das amostras da manhã e da tarde para permitir uma melhor comparação entre os dois períodos diários. Como podemos observar, embora se possa admitir que a sua concentração sofre variações ao longo do dia não existe um padrão diário de variação da concentração desta citocina. Em 9 dos indivíduos observamos uma diminuição da concentração de TNF- α da manhã para a tarde, enquanto em 5 se observa uma tendência para o aumento.

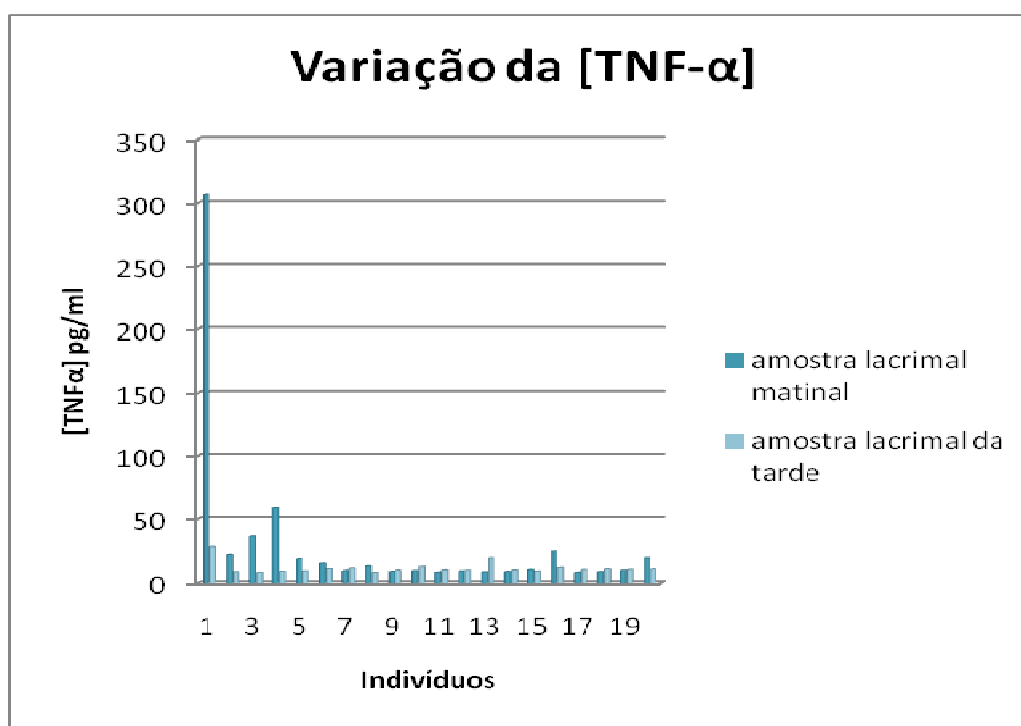


Figura 4.9 – comparação entre as [TNF] do período da manhã (barras azul escuro) e período da tarde (barras azul claro).

A presença de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória associada a patologias do tecido ocular, nesta amostra populacional em estudo, constituída por indivíduos saudáveis não

é uma surpresa pois em estudos anteriormente publicados, tal já se tinha verificado quando se compararam grupos com patologias associadas com grupos controlo saudáveis (Sack *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2007; Lema *et al.*, 2008; Lema *et al.*, 2009; Massingale *et al.*, 2009;). Existe mesmo um estudo recente (Carreño *et al.*, 2010) que teve como objectivo determinar quais as citocinas e quimiocinas presentes nas lágrimas de um grupo de 9 adultos saudáveis não usuário de LC, sem sintomas de olho seco ou patologias oculares associadas. Neste estudo recolheram-se 4 µl de lágrima e avaliou-se a concentração de 30 citocinas e quimiocinas, tendo sido detectadas 25, entre elas o TNF- α . Foi demonstrado que a existência de citocinas inflamatórias não é sinónimo por si só de um estado alérgico ou inflamatório, e que as concentrações encontradas devem ser levadas em linha de conta quando se faz a comparação entre indivíduos saudáveis e aqueles que exibem patologias de superfície ocular.

Os níveis médios de TNF- α encontrados nas amostras lacrimais do presente estudo estão de acordo com o trabalho descrito anteriormente (Carreño *et al.*, 2010) que encontrou uma elevada variedade de valores, 5 -100 pg/ml, entre a população estudada. Contudo, são mais elevadas do que os observados em alguns estudos anteriormente publicados (Yoon *et al.*, 2007; Lema *et al.*, 2008; Lema *et al.*, 2009 e) relativamente a indivíduos não usuários de LC e sem qualquer patologia associada, cujos valores médios variaram entre 1,8 e 0,5 pg/ml.

No nosso estudo no que diz respeito aos valores de concentração de TNF- α ao longo do dia, podemos verificar através do gráfico da figura 4.9 que existem variações durante o ciclo diário, o que vai de encontro ao estudo publicado anteriormente (Uchino *et al.*, 2006) onde se estudou uma população de 28 adultos saudáveis ao longo de 12 meses, em 5 períodos diferentes do dia: 9:00, 12:00, 16:00, 21:00, and 24:00 h. Nesse estudo, verificou-se que o TNF- α , bem como outras citocinas inflamatórias, IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 sofriam alterações na sua concentração. Contudo, ao contrário do estudo de Uchino *et al.* (2006) onde existia um ligeiro aumento no início da manhã e ao fim da tarde, as variações de concentração que foram observadas não têm um padrão de variação estatisticamente significativo. Isto pode ser também explicado pelos períodos

de recolha avaliados (entre as 9:00-10:00 e as 17:00 e 18:00) que são precisamente os períodos onde para esse autor se verificam as concentrações máximas, o que pode justificar a semelhança de valores entre esses dois momentos.

Um dado relevante no estudo de Uchino *et al.* (2006) foi o facto da concentração destas citocinas variar bastante de paciente para paciente, o que também se verificou no nosso estudo, onde se obteve uma gama de concentrações bastante ampla, entre os 306,77 – 8,1265 pg/ml.

Já no que diz respeito à correlação entre a variação dos níveis de TNF- α e o uso de LC, existem estudos que demonstram que o aumento dos níveis de TNF- α lacrimal está directamente correlacionado com a severidade de patologias que envolvem dano do tecido ocular, nomeadamente corneal e não tanto com o uso de LC. No estudo de Lema (Lema *et al.*, 2008) verificou-se que quando comparados os valores de IL-6 e TNF- α de 3 grupos diferentes (grupo com queratocone em estado avançado, grupo com queratocone em estado inicial e grupo controle) os níveis destas citocinas eram muito superiores nos grupos que apresentavam queratocone. No entanto, somente na quantificação de TNF- α se observou que o grupo com queratocone avançado apresentava valores muito superiores relativamente aos restantes, o que sugere que os níveis de TNF- α estão associados à severidade desta patologia corneal.

Num estudo posterior, a mesma autora (Lema *et al.*, 2009) observou, comparando pacientes com queratocone ou miopia, ambos usuários de LC rígidas permeáveis aos gases (RPG) com pacientes nas mesmas condições não usuários, que existia um aumento do TNF- α nos usuários de LC. Contudo, esse aumento era sobretudo significativo nos pacientes com queratocone que requeriam o uso de lentes de contacto, observando-se valores de 21.3 e 3.8 pg/mL para pacientes com queratocone com e sem LC, respectivamente. Ou seja, apesar de se encontrarem valores superiores em míopes usuários de RPG (4.2 pg/ml), comparativamente aos míopes não usuários de LC (1.8 pg/mL), essas variações são ligeiras quando comparadas com as que sucedem em situações de patologia como o queratocone.

4.4 Determinação do Tensão Superficial pelo método de Langmuir-Blodgett

Devido à quantidade mínima necessária de lágrima para realizar esta metodologia ser de 10 μl , não foi possível avaliar a tensão superficial de todos os 20 indivíduos.

A determinação da Tensão Superficial das amostras lacrimais de cada indivíduo foi avaliada consecutivamente, ou seja de um mesmo indivíduo determinou-se a Tensão Superficial da amostra matinal e posteriormente da amostra da tarde, seguindo-se para o paciente seguinte e assim sucessivamente. Desta forma era garantido que as amostras de um mesmo indivíduo eram avaliadas nas mesmas condições de temperatura, uma vez que as amostras lacrimais dos diferentes indivíduos não foram analisadas no mesmo dia, devido ao tempo requerido por esta metodologia.

De seguida, apresenta-se a tabela 4.8, com os valores de pressão superficial obtidos a partir das isotérmicas de Langmuir da lágrima de cada um dos 9 indivíduos.

Tabela 4.8 – Valores de Pressão Superficial obtidos pelo método de Langmuir-Blodgett para as amostras lacrimais do olho esquerdo recolhidas nos dois períodos de avaliação.

Amostra lacrimal matinal		Amostra lacrimal da tarde
Indivíduo	Pressão superficial máxima (mN/m)	Pressão superficial máxima (mN/m)
1	9,707	9,050
2	9,724	9,642
3	8,648	8,169
4	8,815	8,446
5	10,277	9,145
6	3,383	3,903
7	4,929	4,381
8	4,735	4,624
9	7,384	7,055

Antes de analisar as isotérmicas experimentais obtidas para as amostras lacrimais, apresenta-se na figura 4.10 o gráfico de uma isotérmica-tipo (neste caso, obtida para um fosfolípido), com ilustração das várias fases da monocamada (gasosa, líquida, sólida). Este gráfico permitirá uma melhor comparação com as isotérmicas experimentais.

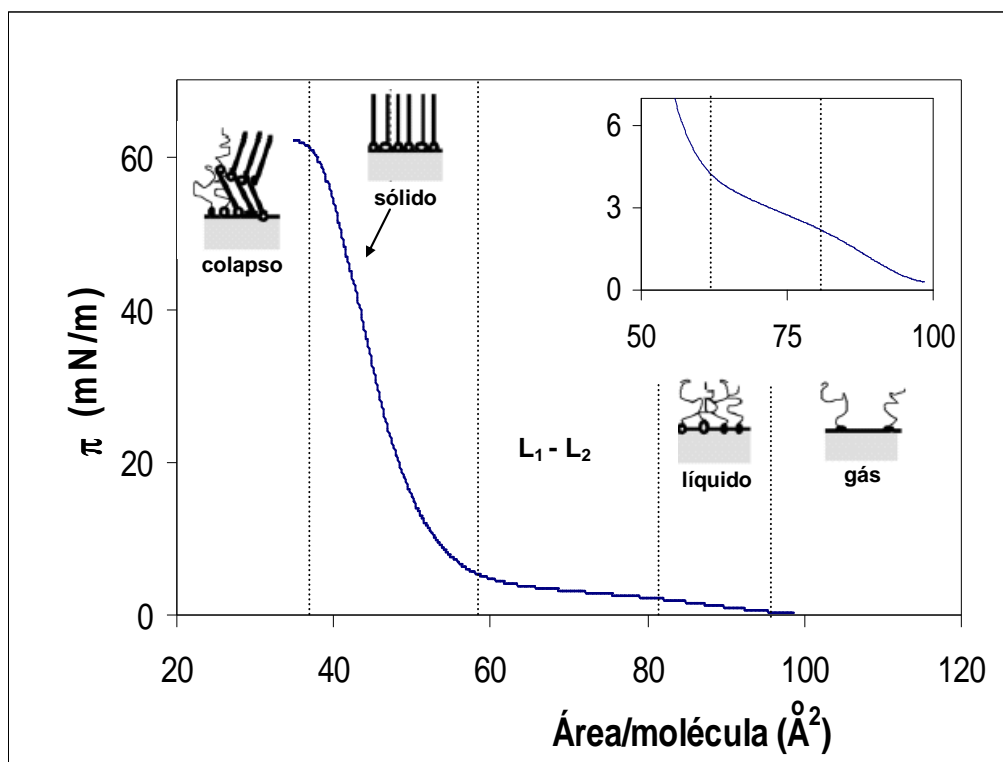


Figura 4.10 - Empacotamento das moléculas em diferentes fases da isotérmica de um fosfolípido.

Nesta figura, inicialmente temos a monocamada na fase gasosa, seguindo-se uma subida suave (notória no pormenor do gráfico inserido) típica da fase líquida expandida (L_1). A seguir, verifica-se a chamada transição de fase horizontal entre duas fases líquidas: expandida, L_1 , e condensada, L_2 (correspondendo à fase inicial da segunda subida). A subida abrupta na pressão superficial corresponde à fase sólida (S), em que há maior saída de moléculas de água da monocamada. Nalguns casos, pode atingir-se a saturação da monocamada, em que já não é possível obter maior compressão sem o colapso da monocamada (Petty, 1996).

Apresentam-se de seguida os traçados de isotérmica de Langmuir para cada um dos nove indivíduos, nos dois períodos do dia em que se efectuou a medição de NIBUT e recolha lacrimal (Figuras 4.11 a 4.19) . Para cada amostra, efectuou-se um ciclo de compressão seguido de um ciclo de expansão.

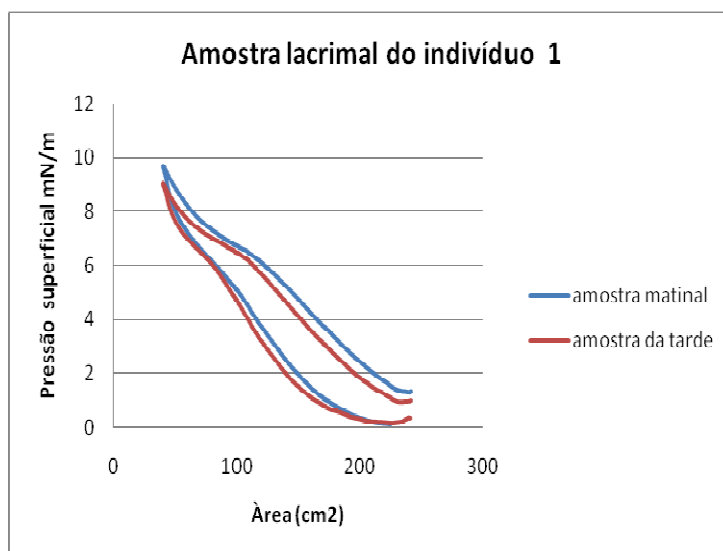


Figura 4.11 - Comparação do traçado das Isotérmica de Langmuir do indivíduo 1, relativamente às amostras recolhidas no período matinal e da tarde.

O filme lacrimal do indivíduo 1 tem maior conteúdo de moléculas à superfície na parte da manhã (maior valor de pressão superficial), relativamente ao período da tarde. O mesmo acontece com alguns dos outros pacientes (figuras seguintes). Perde componentes para o interior da subfase, sendo visível, com as barreiras abertas a variação da pressão superficial após o ciclo de compressão/expansão. É claramente notória (assim como nos indivíduos 2, 3, 4 e 5), uma transição de fase por volta dos 100 cm², correspondendo à passagem da fase líquida expandida para a fase líquida condensada.

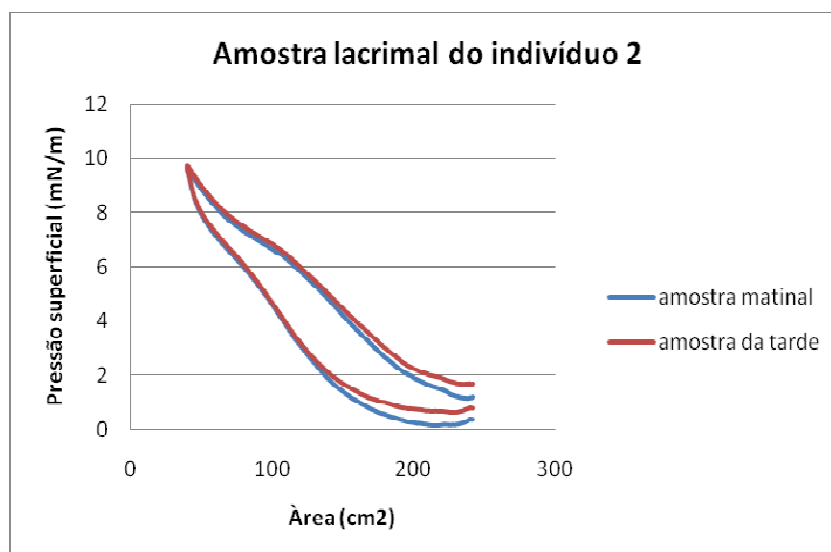


Figura 4.12 - Comparação do traçado das Isotérmica de Langmuir do indivíduo 2, relativamente às amostras recolhidas no período matinal e da tarde.

O indivíduo 2 apresenta uma notável constância das isotérmicas entre a manhã e a tarde, quer na pressão superficial máxima, quer na diferença entre os valores mínimos antes e após da compressão/expansão.

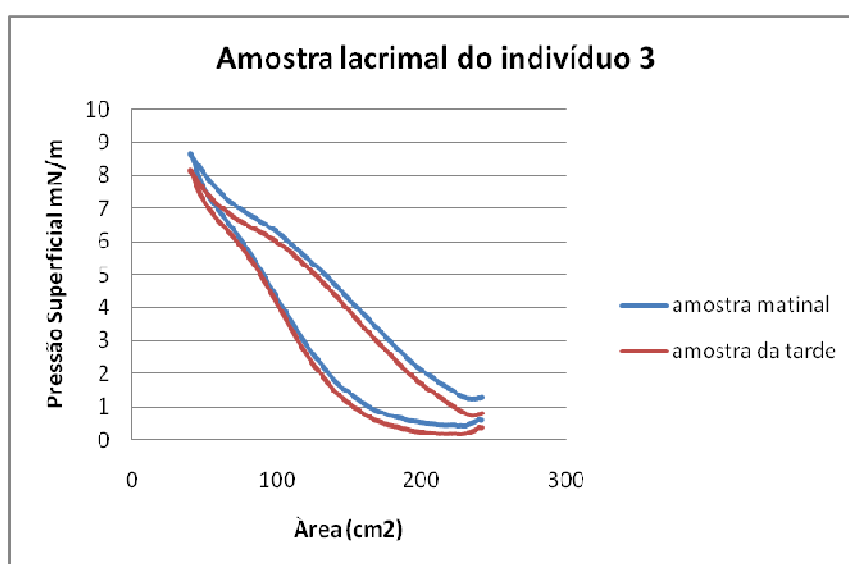


Figura 4.13 - Comparação do traçado das Isotérmica de Langmuir do indivíduo 3, relativamente às amostras recolhidas no período matinal e da tarde.

O comportamento das isotérmicas da lágrima do indivíduo 3 é semelhante ao observado para o paciente 1.

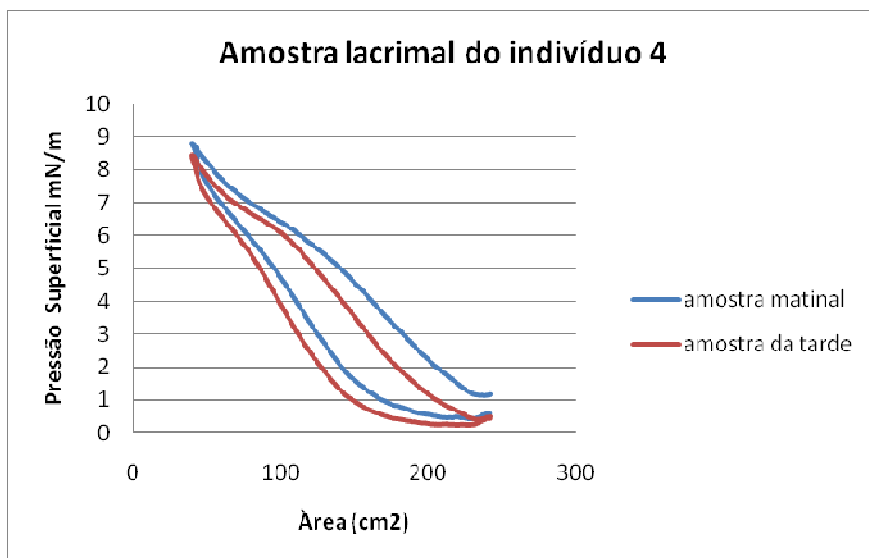


Figura 4.14 - Comparação do traçado das Isotérmica de Langmuir do indivíduo 4, relativamente às amostras recolhidas no período matinal e da tarde.

No caso do indivíduo 4, o comportamento é também similar, mas a isotérmica da tarde não apresenta perdas para a solução após compressão e expansão, indicando alta estabilidade da monocamada da lágrima.

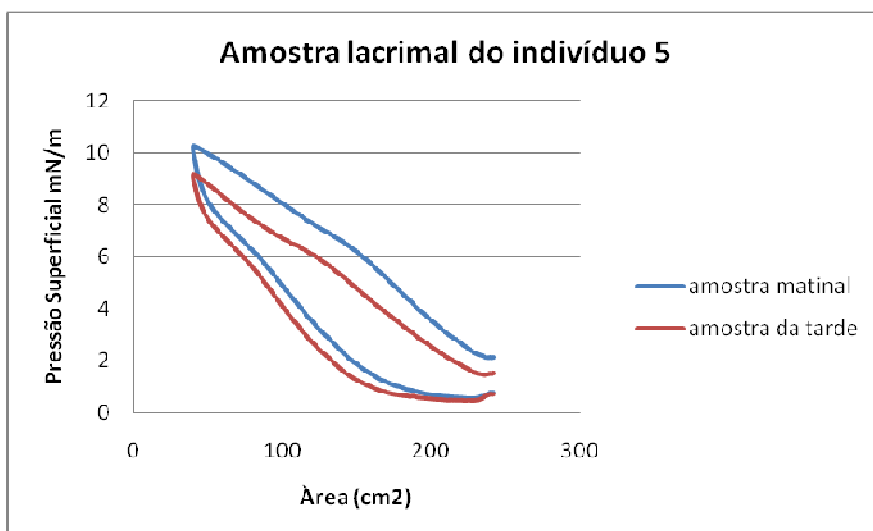


Figura 4.15 - Comparação do traçado das Isotérmica de Langmuir do indivíduo 5, relativamente às amostras recolhidas no período matinal e da tarde.

Em relação aos indivíduos anteriores, a lágrima do indivíduo 5 apresenta uma monocamada com transição de fase menos nítida e maior perda de componentes para a solução da parte da manhã.

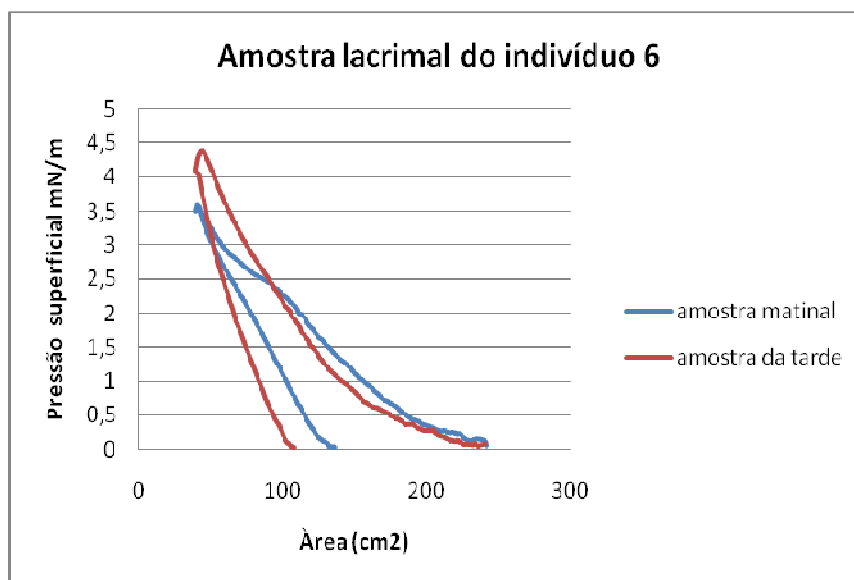


Figura 4.16 - Comparação do traçado das Isotérmica de Langmuir do indivíduo 6, relativamente às amostras recolhidas no período matinal e da tarde.

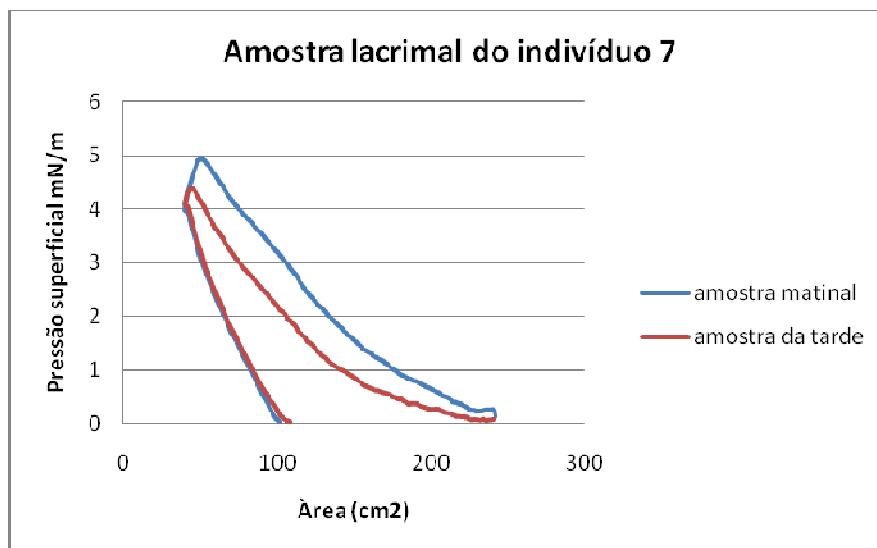


Figura 4.17 - Comparação do traçado das Isotérmica de Langmuir do indivíduo 7, relativamente às amostras recolhidas no período matinal e da tarde.

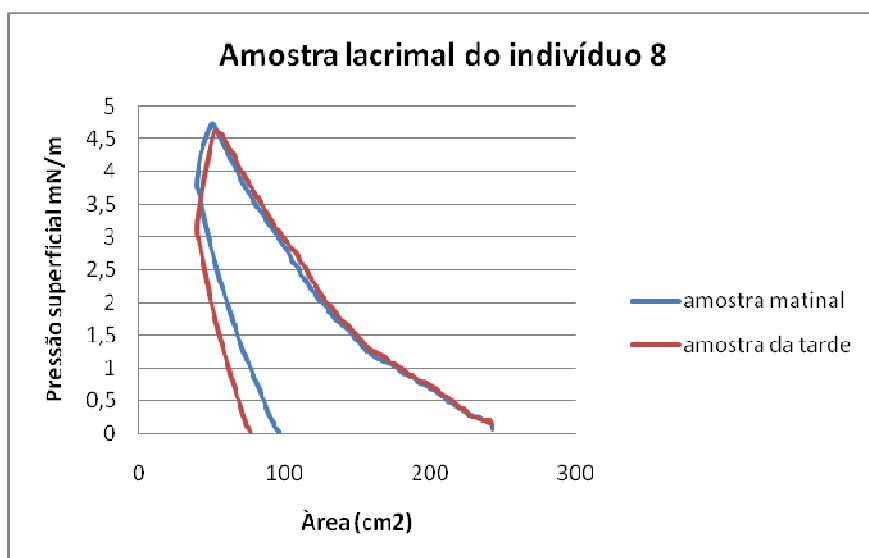


Figura 4.18 - Comparação do traçado das Isotérmicas de Langmuir do indivíduo 1, relativamente às amostras recolhidas no período matinal e da tarde.

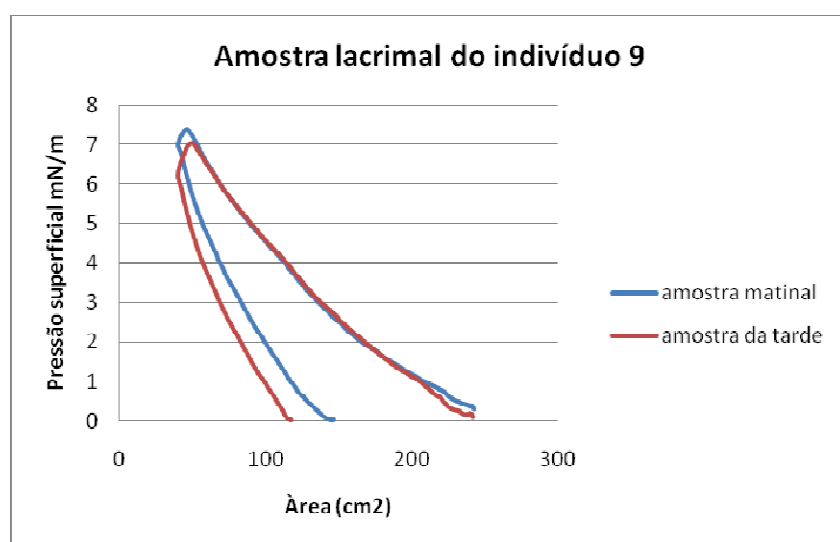


Figura 4.19 - Comparação do traçado das Isotérmicas de Langmuir relativa ao indivíduo 1 das amostras recolhidas no período matinal e da tarde.

No caso dos indivíduos 6, 7, 8 e 9, as isotérmicas revelam monocamadas muito menos estáveis que as anteriores. Os valores máximos de pressão superficial atingida são muito menores, o que releva muito menor conteúdo de moléculas activas de superfície nos

fluidos lacrimais destes pacientes. Assim, também não é evidente a transição de fase observada nos indivíduos anteriores, pelo que temos monocamadas onde apenas é evidente uma fase líquida expandida. Ainda se consegue observar uma transição de fase ténue na compressão da lágrima matinal do indivíduo 6. A estabilidade das monocamadas é, em geral, má, observando-se uma grande perda de moléculas para o interior da subfase, atingindo-se o valor zero antes da expansão total das barreiras da balança. A pior estabilidade foi verificada para o indivíduo 8, em que todos os componentes da monocamada caem para o interior da subfase pouco depois de se iniciar o ciclo de expansão. Nos indivíduos 6,8 e 9, a película lacrimal de manhã apresenta maior estabilidade na monocamada que a da tarde, com menor perda de moléculas para a solução.

Ao observar-mos estes gráficos podemos referir, que quanto às fases da isotérmica da película lacrimal, verifica-se que, para todos os indivíduos, nunca se atinge a fase sólida (subida abrupta a valores elevados de pressão superficial), pois a lágrima não terá moléculas activas de superfície em quantidade suficiente para se atingir a máxima compressão da monocamada com esta microbalança de Langmuir.

Foram comparados o valor de pressão superficial máximo das amostras matinais e da tarde de um mesmo indivíduo. Observou-se através destes resultados que, à excepção do indivíduo 6, existe uma maior pressão superficial no período da manhã relativamente ao período da tarde. Se tivermos em consideração que existe uma relação inversa entre a pressão e a tensão superficial, então podemos afirmar que as amostras matinais têm uma tensão superficial inferior às amostras da tarde. Ao relacionar estes resultados com os valores de NIBUT obtidos e discutidos anteriormente no ponto 4.1 é de notar que existe uma relação entre os valores de NIBUT e a tensão superficial da amostra lacrimal correspondente. Ou seja, a um valor de tensão superficial superior no período da tarde está associado um valor de NIBUT inferior, isto tendo sempre por base a comparação do período matinal e período da tarde de cada indivíduo. Estes resultados podem ser explicados pelo facto de a tensão superficial de um líquido, estar associada à sua energia coesiva. Quanto mais alta se mostrar a energia coesiva entre as moléculas que compõem o filme lacrimal, mais difícil será o seu espalhamento e consequentemente menor a sua estabilidade lacrimal, avaliada por NIBUT.

Estes resultados estão de acordo com diversos estudos publicados (Tiffany *et al.*, 1989; Poonam *et al.*, 2006; Georgiev *et al.*, 2010). Tiffany *et al.* (1989), refere que pacientes com olho seco apresentam valores de tensão superficial superiores quando comparados com pacientes sem essa sintomatologia. Isto suporta o nosso estudo, já que é sabido que à síndrome de olho seco está associado um valor de NIBUT mais baixo. A relação entre a tensão superficial e a estabilidade do filme lacrimal, também é por outro estudo publicado, recentemente por Georgiev *et al.* (2010). Estes investigadores concluíram que os lipídios polares presentes no filme lacrimal têm a capacidade de interagir com as secreções da glândula de meibómio, aumentando a pressão superficial. Por sua vez estes resultados estavam correlacionados com a capacidade das lágrimas artificiais que contêm estes lipídios aumentarem a estabilidade do filme lacrimal. Poonam *et al.* (2006) verificaram que a lisozima, tal como os lípidos presentes na lágrima contribui para o aumento da pressão superficial e que consequente, este aumento da pressão superficial estava relacionado com o aumento da estabilidade da camada lipídica e do filme lacrimal.

Capítulo 5. Conclusões

A investigação para obtenção de melhor caracterização das propriedades da película lacrimal torna-se fundamental para que os pacientes usem as LC de uma forma segura e confortável. Com este trabalho pretende-se dar alguma contribuição, observando e estudando alguns dos aspectos já referidos. Foram medidas objectivamente uma imunoglobulina e uma citocina, ao mesmo tempo que se determinou a tensão superficial e estabilidade lacrimal. As alterações observadas podem ser resumidas da seguinte forma:

Após a avaliação dos resultados obtidos neste estudo, pode concluir-se que não existem diferenças significativas no perfil lacrimal proteico entre o olho direito e esquerdo de um mesmo indivíduo. Também no que diz respeito à estabilidade do filme lacrimal não existem diferenças significativas entre o NIBUT do olho esquerdo relativamente ao direito.

Existem variações diurnas na constituição do filme lacrimal. Estes resultados preliminares podem apontar para que as alterações e sintomatologia encontrada em usuários de LC, não têm que ser necessariamente provocadas pelo seu uso ou presença de patologias oculares ou sistémicas, mas sim por um factor fisiológico. Os clínicos e investigadores devem considerar estas diferenças diurnas quando são feitas comparações entre estudos ou populações e até quando o mesmo indivíduo é observado em diferentes períodos.

A estabilidade lacrimal é superior no período matinal, o que pode explicar a sensação de seca e desconforto no final do dia, referenciada pelos diversos indivíduos, quer os usuários, quer os não usuários de LC quando realizam tarefas específicas, como é o caso do uso de computadores, ou quando apresentam intolerâncias a certas condições de temperatura e humidade dos locais frequentados.

No que diz respeito ao perfil proteico, verifica-se que a quantidade de algumas das principais proteínas lacrimais não permanece constante. Ao quantificar a IgA é possível observar que esta imunoglobulina tem concentrações muito superiores no período entre as 9h e 10h horas, comparativamente ao período entre as 17h e 18h. Quanto ao TNF- α verifica-se que não existe um padrão diário de variação, contudo é de notar que esta citocina frequentemente associada a patologias inflamatórias também se encontra no filme lacrimal de indivíduos saudáveis, logo a sua presença não deve ser encarada por si só como sinónimo de possível complicação ocular.

Para além da constituição do filme lacrimal sofrer alterações ao longo do dia, também as suas propriedades não são constantes ao longo do ciclo diário. Observou-se que a estabilidade do filme lacrimal é superior no período matinal e que essa estabilidade está correlacionada com a tensão superficial de forma inversamente proporcional, ou seja, à medida que a tensão do fluido lacrimal aumenta, a sua estabilidade diminui.

Estes resultados podem ser úteis na exclusão de variações normais nos níveis de determinadas proteínas quando comparados com níveis de proteínas em amostras lacrimais de pacientes com patologias associadas ou usuários de LC

Capítulo 6. Perspectivas Futuras

Apesar de existirem já alguns trabalhos que abordam a temática da lágrima, quer do ponto de vista da Bioquímica, quer do ponto de vista da Contactologia, são ainda poucos os que associam as duas áreas. Como tal houve a necessidade de preparar e adaptar a metodologia anteriormente conhecida a este novo objecto de estudo. Alguns dos problemas que foram surgindo, foram sendo resolvidos ao longo do trabalho, durante a optimização da metodologia. Contudo, após estes primeiros resultados, tornou-se evidentes que alguns dos temas podem ser alvo de uma maior exploração.

No que diz respeito à análise do TNF- α , parece importante aumentar os períodos de avaliação diária, para além dos dois já avaliados já que os períodos do dia analisados são sinalizados num estudo anterior como os de maior concentração. Desta forma poderão estar a escapar períodos do dia onde as concentrações são efectivamente menores e capazes de estabelecer um ciclo de variação diurno, não detectável neste projecto. Ainda referente ao TNF- α será importante monitorizar os seus valores num grupo de indivíduos ao longo de 12 meses e verificar se a elevada amplitude de concentrações que se encontra na lágrima é característica de cada um dos indivíduos, ou se por sua vez cada um deles experimenta uma ampla variação temporal.

Um outro aspecto a aprofundar será qual ou quais as proteínas ou lípidos que influenciam directa ou indirectamente os valores de tensão superficial e NIBUT, tentando estabelecer uma relação entre a sua concentração e a estabilidade lacrimal.

Num futuro próximo este estudo deverá ser alargado em termos de população alvo, nomeadamente sob o ponto de vista etário e género, para verificar se estas variações fisiológicas diárias estão de alguma forma condicionada à idade ou género.

Neste projecto, a amostra populacional era na sua totalidade universitária, o que fazia com que o seu dia fosse passado na sua grande parte num espaço comum; a

Universidade do Minho. Numa nova abordagem será importante que a amostra seja constituída por elementos de diferentes local de trabalho, monitorizando o local em termos de temperatura, luminosidade, humidade e poluição, pois indivíduos que passam grande parte do dia em ambientes com ar condicionado ou sujeitos a fumo são geralmente os que apresentam maior sintomatologia de desconforto, quer sejam usuários de LC ou não.

Capítulo 7. Referências Bibliográficas

Abbas AK. (2002). Cellular and Molecular Immunology, 4th Edition. Saunders.

Berman ER. (2002). Biochemistry of the EYE, perspectives in vision research. PLENUN PUBLISHING CORPORATION.

Bitton F., Etty OD., Keech F., Adam BS., Lyndon J., Trefford S. (2008). Subjective and Objective Variation of the Tear Film Pre- and Post-Sleep. Optometry & Vision Science, Vol 85 (8), pp. 740-748.

Booz ML. (2001). Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide.

Burgess TL., Kelly RB. (1987). Constitutive and regulated secretion of proteins. Annual Review of Cell Biology, Vol 3, pp.243-248.

Carreño E., Enríquez-de-Salamanca A., Tesón M., García-Vázquez C., Stern ME., Whitcup SM., Calonge M. (2010). Cytokine and chemokine levels in tears from healthy subjects. Acta Ophthalmologica online, Vol 25.

Carvalho A. (2006) Transferencia de energia em multicamadas de fosfolípidos produzidos pela técnica de Langmuir-Blodgett. Tese de Mestrado, Universidade do Minho.

Choy CK., Cho P., Chung WY. (2001). Water-soluble antioxidants in human tears: Effect of the collection method. Invest Ophthalmology Vision Science, Vol 42(13), pp. 3130-3134.

Cho p., Hoky H., Huang YC., Chuy HY., Kwan MC. (2004). Xeroscope, queratómetro Comparision of Noninvasive Tear Break-up Time from Black and White Background Instruments. Optometry and Vision Science, vol 81(6), pp. 436-441.

Cho P., Mak S., Lee A. (2000). Variability of tear protein levels in normal young adults: between-day variation. Archive for Clinical Experimental Ophthalmology, Vol 238, pp. 892-899.

Creech JL., Do LT., Fatt I., Radke CJ.(1998) In vivo tear-film thickness determination and implications for tear-film stability. Current Eye Research, Vol 17, pp. 1058-1066.

Farris RL. (1985). Tear Analysis in Contact Lens Wearers. Transation of the American. Ophtalmology Societ, Vol 83, pp 256-287.

Fullard RJ., Snyder C. (1990). Protein Levels in Nonstimulated and Stimulated Tears of Normal Human Subjects. Investigative Ophthalmology & Visual Science, Vol. 31(6).

Fullard RJ., Tucker DL. (1991). Changes in human tear protein levels with progressively increasing stimulus. Investigative Ophthalmology & Visual Science, vol 32, pp. 2290 - 2301.

Gachon A., Richard J. (1982). Human Tears: protein pattern and individual protein determination in adults. Current Eye Research, Vol 2, pp. 301-308.

Gachon AM., Verrelle P., Betail G., Dastugue B. (1979). Immunological and electrophoretic studies of human tear proteins. Experimental Eye Research, Vol 29, pp. 539.

Garg A., Sheppard D., Meyer, Mehta. (2008). Ojo seco y transtornos de la superfície ocular. Editorial média Panamerica.

Georgieva G., Kutsarova E., Jordanov A., Krastev R., Lalcheva Z. (2010). Interactions of Meibomian gland secretion with polar lipids in Langmuir monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol 78, pp.317–327.

Gesser HD. (2000) A Demonstration of Surface Tension and Contact Angle. *Journal of Chemical Education*, Vol 77, pp. 58-59.

Glassonac MJ., Stapleton F., Keay L. (2006). The effect of short term contact lens wear on the tear film and ocular surface characteristics of tolerant and intolerant wearers. *Contact Lens & Anterior Eye*, Vol 29 (1), pp.41-47.

Guillon J.P. (1998). Non Invasive Tearscope Plus Routine For Contact Lens Fitting. *Contact Lens and Anterior Eye*, Vol 21, pp S31-S40.

Hoshino M., Shoji J., Inada N., Sawa M., Kato H. (2006). Clinical evaluation of a measurement method for secretory IgA in tears. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, Vol 110 (4), pp.276-281.

James P. M., Ward E. S. (2001). The Lipid Layer: The Outer Surface of the Ocular Surface Tear Film. *Bioscience Reports*, Vol 21(4), pp.407-419.

Jane V., John M., Ian D. (2002). *Essential Contact Lens Practice*, Optician. BUTTERWORTH-HEINEMANN.

Kari B. Green-Church, Kelly K. N., Nan M. K., Liwen Z., Jason J. N. (2008). Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches. *Molecular Vision*, Vol 14, pp. 456–470.

Kasahara S., Kazuki A., Kuniaki S., Kenji S., Hiroyasu I., Tetsuya I., Hiroo O., Mitsuru S., Shinichi K., Hisataka M. (2003). Tumor Necrosis Factor Alpha Induces Impaired Proliferation of Hepatitis B Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes. *Journal of Virology*, Vol. 77 (4), pp. 2469-2476.

King-Smith PE., Fink BA., Hill RM., Koelling KW., Tiffany JM. (2004). The thickness of the tear film. *Current Eye Research*, Vol 29, pp. 357-368.

Larke J.R.. *The Eye In Contact Lens Wear*; second edition. (2001). BUTTERWORTH HEINEMANN.

Lema I., Durán JA., Ruiz C., Díez-Feijoo E., Acera A., Merayo J . (2008). Inflammatory response to contact lenses in patients with keratoconus compared with myopic subjects. *Cornea*, Vol 27(7), pp. 758-63.

Lema I., Sobrino T., Durán JA., Brea D., Díez-Feijoo E. (2009). Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears. *British Journal of Ophthalmology*, Vol 93(6), pp.820-824.

Liotet S., Morin Y. (2000). *Guía práctica de los exámenes de laboratorio en Oftalmología*. MASSON.

Massingale ML., Li X, Vallabhajosyula M., Chen D., Wei Y., Asbell PA. (2009). Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients. *Cornea*, Vol 28(9), pp.1023-1227.

Méijome JM. (2005). *Contactologia*. José Manuel González-Méijome, Publidisa.

Mengher LS., Bron AJ., Tongue SR., Gilbert DJ. (1985) Effect of fluorescein instillation on the pré-corneal tear film stability. *Current Eye Research*; Vol 4, pp. 9-12.

Minatti, E. (2007). *Interação entre Polímeros e Surfactantes*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.

Mohidin N., Bay TC., Yap M. (2002). Non-invasive tear break-up time in normal Malays. *Clinical Experimental Optometry*, Vol 85(1), pp. 37-41.

Nagyova B., Tiffany JM. (1999). Components responsible for the surface tension of human tears. *Current Eye Reseach*, Vol 19, pp. 4- 11.

Patel S., Murray D., Mckenzie A., Shearer DS., Mcgrath BD. (1985). Effects of fluorescein on tear break up time and on tear thinning time. *American Journal of Optometry and Physiological Optics*, Vol, 62, pp.188 -190.

Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, Glaccum MB, Otten C, Willis CR, Charrier K, Morrissey PJ, Ware CB, and Mohler KM. (1998). TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *Journal of Immunology*, Vol 160, pp. 943-952.

Peter TJ., Paul OD. (1983). Origin and Biosynthesis of Human Tear Fluid Proteins. *Investigative Ophthalmology Vision Science*, Vol 24, pp. 623-630.

Petty MC. (1996). *Langmuir-Blodgett films. An Introduction*. Cambridge University Press.

Poonam M., Margaux T., Thomas J. M. (2006). Adsorption of lysozyme to phospholipid and meibomian lipid monolayer films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol 48, pp.128 – 137.

Puinhas, A. (2004). Protein Engineering of *Candida rugosa* Lip1 Towards activity under extreme conditions of pH and temperature. Tese de Licenciatura, Universidade da Beira Interior.

Robert A., Sack KOT., Ami T. (1992). Diurnal Tear Cycle: Evidence for a Nocturnal Inflammatory Constitutive Fluid. Investigative Ophthalmology & Visual Science, vol 33(3), pp. 626-640.

Robert S., Lenard C., Ann B., Sonal S., Nancy M., Andrea L. (2007). Antibody array characterization of inflammatory mediators in allergic and normal tears in the open and closed eye environments. Current Eye Research, Vol 85(4), pp. 528-538.

Sen DK., Saring GS., Mathur GP., Saha K. (1978). Biological variation of immunoglobulin concentrations in human normal tears related to age and sex. Acta Ophthalmologica, Vol 56, pp. 439-444.

Snyder C., Fullard RJ. (1991). Clinical profiles of non dry eye patients and correlations with tear protein levels. International Ophthalmology, vol. 15, pp. 383 – 389.

Sonoda S., Uchino E., Nakao K., Sakamoto T. (2006). Inflammatory cytokine of basal and reflex tears analysed by multicytokine assay. British Journal of Ophthalmology, Vol, 90, pp. 120-122.

Stapleton F., Willcox MDO., Morris CA., Sweeney DF. (1999). Tear changes in contact lens wearers following overnight eye closure. Current Eye Research, Vol. 17(2), pp. 183-188.

Sudi P., Kenny JB. (2003). The dry eye A Practical Approach. BUTTERWORTH – HEINEMANN.

Tan KO., Sack RA., Holden BA., Swarbrick HA. (1993). Temporal sequence of changes in tear film composition during sleep. *Current Eye Research*, Vol, 12, pp.1001-1007.

Tiffany JM., Winter N., Bliss G. (1989). Tear film stability and tear surface tension. *Current Eye Research*, Vol 8, pp. 507-515.

Tiffany J.M. (2006). SURFACE TENSION IN TEARS. *Archivos de la Sociedade Espanõla de Oftalmologia*, Vol 81, pp. 363-366.

Uchino E., Sonoda S., Kinukawa N., Sakamoto T.(2006).Alteration pattern of tear cytokines during the course of a day: diurnal rhythm analyzed by multicytokine assay. *Cytokine*. 7;33(1), pp.36-40 .

Vesaluoma, Rosenberg, Teppo, Gronhgen-Risca, Haahtela,Tervo. (1999). Tumour necrosis factor alpha (TNF α) in tears of atopic patients after conjunctival allergen challenge. *Clinical & Experimental Allergy*, Vol 29(4), pp. 537-542.

Wellmer A., Gerber J., Ragheb J., Zysk G.,Tammo K., Smirnov A., Wolfgang B., Roland N. (2001). Effect of Deficiency of Tumor Necrosis Factor Alpha or Both of Its Receptors on *Streptococcus pneumonia* Central Nervous System Infection and Peritonitis. *Infection and Immunity*, vol. 69(11), pp. 6881-6886.

Wookoff P., Skov P., Franck C., Petersen LN. (2003). Eye irritation and environmental factors in the office environment – hypotheses, causes and the physiological model. *Scandinavian Journal of Work Environment Health*, vol 29(6), pp. 411-430.

Yoon KC., Jeong IY., Park YG., Yang SY. (2007).Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in tears of patients with dry eye syndrome. *Cornea*, Vol 26(4), pp. 431-437.

Anexos

Na tabela seguinte apresentam-se os valores de NIBUT dos 20 indivíduos, que foram tratados estatisticamente e apresentados na tabela 4.1

Tabela 8.1 – Valores das 3 medidas NIBUT realizadas, durante o período da manhã e da tarde, de cada um dos 20 indivíduos.

	NIBUT manhã (OD) (s)			NIBUT tarde (OD) (s)			NIBUT manhã (OE) (s)			NIBUT tarde (OE) (s)		
Indivíduo	1º	2º	3ª	1º	2º	3ª	1º	2º	3ª	1º	2º	3ª
	Medida			Medida			Medida			Medida		
1	21,4	22,0	21,6	20,1	18,5	19,3	23,9	23,4	23,9	12,1	11,9	12,2
2	17,4	16,9	17,8	11,0	9,8	9,8	16,1	16,8	15,8	9,5	10,0	11,1
3	17	17,7	17,4	9,2	8,9	9,1	20,2	20,3	20,5	12,1	12,3	11,8
4	17,8	17,5	17,2	12,9	13,1	13,4	10,6	10,6	10,2	11,1	11,6	11,0
5	16,8	16,9	16,2	12,6	12,1	11,8	16,0	16,1	16,5	12,0	12,2	12,1
6	13,2	13,0	13,6	4,1	5,2	4,3	13,6	13,4	13,7	5,4	5,0	5,7

7	14,2	15,0	14,1	11,1	10,3	10,4	19,4	19,9	19,8	17,7	17,2	17,7
8	15,5	16,2	14,9	7,0	7,0	7,3	22,1	19,7	22,7	7,6	7,5	7,2
9	23,8	23,4	24,2	16,9	17,3	17,2	29,7	29,2	29,3	17,1	16,8	17,3
10	10,7 (p)	10,2 (p)	11,8 (p)	5,9 (p)	6,9 (p)	6,3 (p)	6,2 (p)	7,6	6,8	5,6 (p)	5,9	6,2
11	14,5 (p)	15,0	14,9	17,1	18,0	17,3	20,2 (p)	20,9	20,4	21,2	21,8	22,1
12	11,7 (p)	12,2	11,8	17,1	17,5	18,2	12,8	13,2	12,8	16,5	16,5	16,9
13	15,7	15,9	15,4	13,9	14,0	14,2	----	----	----	----	----	----
14	17,8	18,2	18,3	15,9	15,7	16,4	20,9	21,8	21,1	17,4	17,7	18,2
15	16,0	17,0	16,4	11,2	11,5	11,0	14,1	14,2	13,9	10,8	10,2	10,1
16	16,6	16,9	16,5	9,9	8,8 (p)	8,2 (p)	17,3	16,9	17,1	15,6	15,8	15,6
17	19,6	19,8	19,9	16,0	16,5	16,1	21,0	20,6	20,3	16,6	17,3	17,2

18	18,0	18,2	18,2	14,2	14,8	14,7	17,9	17,6	17,5	15,1	15,3	15,0
19	19,4	19,9	20,3	15,7	15,1	15,3	19,0	19,7	19,1	15,2	15,9	16,2
20	19,8	20,6	20,4	16,1	16,9	16,4	20,8	21,5	21,0	16,8	16,5	16,7